

PCT

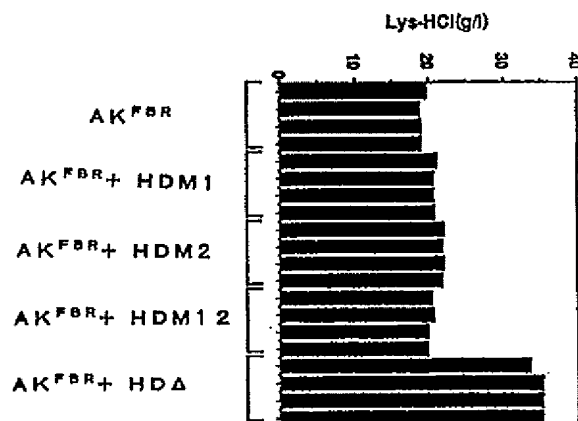
世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12N 15/53, C12P 13/08</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO95/23864</b>  <b>(43) 国際公開日</b> <b>1995年9月8日 (08.09.95)</b>
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP95/00268 <b>(22) 国際出願日</b> 1995年2月23日 (23.02.95)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平6/35019 1994年3月4日 (04.03.94) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)[JP/JP] 〒104 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b> 杉本雅一(SUGIMOTO, Masakazu)[JP/JP] 〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 生産技術研究所内 Kanagawa, (JP) 臼田佳弘(USUDA, Yoshihiro)[JP/JP] 鈴木智子(SUZUKI, Tomoko)[JP/JP] 田中朗子(TANAKA, Akiko)[JP/JP] 松井 裕(MATSUI, Hiroshi)[JP/JP] 〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP)		<b>(74) 代理人</b> 弁理士 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)  <b>(81) 指定国</b> BR, CN, JP, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書

**(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING L-LYSINE**

**(54) 発明の名称** L-リジンの製造法



**(57) Abstract**

A coryneform bacterium having a high L-lysine productivity is provided by integrating a gene coding for a coryneform-origin aspartokinase released of feedback inhibition caused by L-lysine and L-threonine into a DNA of a chromosome of a coryneform bacterium carrying attenuated homoserine dehydrogenase or a coryneform bacterium deficient in a homoserine dehydrogenase gene.

(57) 要約

弱化型ホモセリンデヒドロゲナーゼを保持するコリネホルム細菌またはホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子を欠損するコリネホルム細菌の染色体DNAに、L-リジン及びL-スレオニンによるフィードバック阻害が解除されたコリネホルム細菌由来のアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を組み込んで、L-リジン生産性の高いコリネホルム細菌を提供する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SG	シンガポール
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア共和国
BF	ブルキナ・ファソ	GA	ガボン	MC	モナコ	SN	セネガル
BJ	ブルンジ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TD	チュニジア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モロッコ	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

## L-リジンの製造法

### 発明の背景

本発明は微生物工業に関連したものであり、詳しくは、発酵法によるL-リジンの製造法及びこの製造法に好適なコリネホルム細菌に関するものである。

従来、L-リジンはプレバクテリウム属、コリネバクテリウム属、バチルス属、またはエシェリヒア属に属するL-リジン生産菌を用いた発酵法により製造されており、これらの微生物の生合成系において、オキザロ酢酸からアスパラギン酸、アスパラギン酸 $\beta$ アルデヒド等を経由して合成される。このようなL-リジン生合成経路にはホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、アスパルトキナーゼ、ジヒドロジピコリン酸合成酵素などの種々の酵素が関与しているが、これらの酵素は最終生産物であるL-リジンや中間生成物であるアスパラギン酸などによるフィードバック阻害を受けるものが多いために、発酵法によりL-リジンを製造する場合、生産性を向上させるために、このような阻害を受けないような変異株が多く用いられている。

例えば、プレバクテリウム属やコリネバクテリウム属のようなコリネホルム細菌においては、アスパルトキナーゼ（以下、「AK」という）は、L-リジン及びL-リジン合成経路からの分岐経路で合成されるL-スレオニンによる協奏阻害を受けることが知られており、この阻害を受けないAKを保持する変異株がL-リジン生産に用いられている（J. Gen. Appl. Microbiol., 16, 373-391(1970)）。

また、L-リジンの発酵生産には、L-リジンの生産性に最も影響を与える酵素といわれているホモセリンデヒドロゲナーゼ（以下、「HD」という）を欠損した変異株も用いられている。これは、L-リジン合成系路からアスパラギン酸 $\beta$ -アルデヒドを介して分岐するL-スレオニン固有の合成系路において、第一の反応であるアスパラギン酸 $\beta$ -セミアルデヒドからL-ホモセリンを生成する反応を触媒するHDが欠失しているためにL-スレオニンが合成されず、その結果AK活性が阻害されずにL-リジン合成反応が進行するためである。このよう

なHD欠損株としては、コリネホルム・グルタミカムのHD完全欠損株が知られている (Nakayama, K. et al.; J. Gen. Appl. Microbiol. 7(3), 145-154(1961))。

上記のようなHD完全欠損株に対し、いわゆる弱化型 (leaky type) HDを保持する変異株もL-リジン生産に有効であると考えられる。HD完全欠損株はL-スレオニン及びL-メチオニンを合成できないために、培地中にこれらのアミノ酸が存在しないと生育することができない。これに対して、L-リジン生産を抑制するほどには実質的に活性を示さないが、ごく僅かにHD活性を有する弱化型HDを保持するHD弱化株を取得することができれば、培地にL-スレオニンやL-メチオニンを添加しなくても生育が可能となり、培地調製が簡便になる。

また、弱化型HDは、基質であるアスパラギン酸 $\beta$ -セミアルデヒドに対する親和性が小さくなっている。したがって、HD弱化株は生育に必要なL-スレオニン、L-メチオニン及びL-イソロイシンを合成するために著量のアスパラギン酸 $\beta$ -セミアルデヒドを合成する。著量に合成されたアスパラギン酸 $\beta$ -セミアルデヒドは結果としてL-リジンへと流れることとなる。

その一方で、L-スレオニンの生成量を完全に抑える点でHD完全欠損株は今なお有用であると考えられるが、突然変異によるHDの欠損は復帰変異によって活性が戻る可能性があり、そのような可能性の極めて低いHD遺伝子が破壊されたHD欠損株が一層有用であると考えられる。尚、HD遺伝子の塩基配列は、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) についてはPeoplesらにより報告されている (Peoples, O. P. et al., Molecular Microbiology 2(1), 63-72 (1988))。

また、HD弱化株及びHD欠損株はL-スレオニンを生産しないので、AKはフィードバック阻害を受けない。したがって、HD弱化株及びHD欠損株の細胞中でAK遺伝子が増幅されれば、L-リジン合成反応が進み、L-リジン生産性が向上すると考えられる。さらに、L-リジン及びL-スレオニンによるフィードバック阻害を受けないAKの変異とHDの弱化あるいは欠損とを併せてコリネホルム細菌に導入することにより、L-リジン生産性はより一層向上すると考えられる。

### 発明の概要

本発明は、上記観点からなされたものであり、コリネホルム細菌のＬーリジン生産性を向上させるために、ＨＤ弱化株及びＨＤ遺伝子破壊株を得ること、及びＡＫ遺伝子が増幅されたＨＤ弱化株及びＨＤ欠損株、さらにはＬーリジン及びＬースレオニンによるフィードバック阻害を受けないＡＫを保持するＨＤ弱化株及びＨＤ遺伝子破壊株を提供することを課題とする。

本発明者は、上記課題を解決するためにブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) のＨＤ弱化変異株を取得し、野生型ＨＤ遺伝子及び弱化型ＨＤ遺伝子を単離してその構造を明らかにし、弱化型ＨＤ遺伝子及び一部を欠失したＨＤ遺伝子をブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタムの野生株に導入することによってＬーリジン生産性が向上したＬーリジン生産株を創成し、さらにこうして得られたＬーリジン生産株の細胞中でＡＫ遺伝子を増幅することにより、あるいはＬーリジン及びＬースレオニンによるフィードバック阻害を受けないＡＫをコードする遺伝子を導入することにより一層Ｌーリジン生産性を向上させることに成功し、本発明に至った。

すなわち本願発明は、Ｎ末端から２３番目のロイシン残基及び１０４番目のバリン残基の少なくとも一方が他のアミノ酸残基に変化した変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードするＤＮＡ断片、Ｎ末端から２３番目のロイシン残基及び１０４番目のバリン残基の少なくとも一方が他のアミノ酸残基に変化した変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を保持するコリネホルム細菌、及び前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がコリネホルム細菌の染色体上のホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子との相同組換えにより染色体ＤＮＡに組み込まれて形質転換されたコリネホルム細菌を提供する。

また本願発明は、コリネホルム細菌由来のホモセリンデヒドロゲナーゼの一部をコードするＤＮＡ断片が、コリネホルム細菌の染色体上のホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子との相同組換えにより染色体ＤＮＡに組み込まれることによって、ホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子が破壊されたことを特徴とするコリネホルム細菌を提供する。さらに本願発明は、コリネホルム細菌由来のアスパルトキナー

ゼ遺伝子とコリネホルム細菌細胞内で自律複製可能なベクターとを連結してなる組換えDNAを細胞内に保持し、かつ、野生型ホモセリンデヒドロゲナーゼを発現しないことを特徴とするコリネホルム細菌、コリネホルム細菌由来のアスパルトキナーゼであってL-リジン及びL-スレオニンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子が、コリネホルム細菌の染色体DNAに組み込まれて形質転換され、かつ、野生型ホモセリンデヒドロゲナーゼを発現しないことを特徴とするコリネホルム細菌を提供する。さらに本願発明は、上記コリネホルム細菌を好適な培地で培養し、該培養物中にL-リジンを生産蓄積せしめ、該培養物からL-リジンを採取することを特徴とするL-リジンの製造法を提供する。

尚、本明細書においては、野生型HDまたは野生型AKを生産する株を「野生株」、実質的にはHD活性をほとんど示さないが、ごく僅かにHD活性を有する弱化型(leaky type)の変異を有するHDを単に「変異型HD」、L-リジン及びL-スレオニンによるフィードバック阻害を受けないような変異を有するAKを「変異型AK」、さらに一部を欠失したHD遺伝子を「欠失型HD遺伝子」ということがある。また、外来HD遺伝子または外来AK遺伝子とベクターとからなる組換えDNAを宿主染色体DNA上のHD遺伝子またはAK遺伝子との相同組換えにより染色体DNAに組み込むことを「遺伝子組込み」、この組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた状態から、1コピーのHD遺伝子またはAK遺伝子をベクターとともに脱落させることにより、染色体上のHD遺伝子またはAK遺伝子が外来HD遺伝子または外来AK遺伝子に置換された状態にすることを「遺伝子置換」という。さらに、変異型HD遺伝子を保持する突然変異株または変異型HD遺伝子で遺伝子置換された株を単に「HD変異株」、一部を欠失したHD遺伝子で遺伝子置換された株を「HD欠損株」ともいう。

また、本発明にいうコリネホルム細菌とは、バーギーズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)第8版599頁(1974)に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、孢子形成能を有しない桿菌であり、コリネバクテリウム属細菌、及び従来ブレヴィバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリ

ウム属細菌として統合されたブレビバクテリウム属細菌、さらにコリネバクテリウム属細菌と非常に近縁なブレビバクテリウム属細菌を含む。

本発明により得られるHD変異株は、L-リジン生産性にすぐれており、培地中にL-メチオニン及びL-スレオニン、またはL-ホモセリンが存在していなくても生育できる。また、本発明のHD欠損株は、HD遺伝子が発現しないのでL-リジン生産性に優れ、さらにこの性質を安定して保持することができる。

さらに、AK遺伝子が増幅されたHD変異株及びHD欠損株、変異型AK遺伝子を保持するHD変異株及びHD欠損株は、より一層L-リジン生産性に優れている。

### 発明の詳細な説明

以下、本発明を詳細に説明する。

#### < 1 > 弱化型HD突然変異株及び変異型HD遺伝子の取得

弱化型変異を有するHDを生産する突然変異株は、野生型HDを生産するコリネホルム細菌を変異処理することにより得られる。コリネホルム細菌の変異処理には、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 等の通常人工突然変異に用いられている変異剤による処理を行う。

変異処理した菌体からシングル・コロニー・アイソレーションを行い、各々のコロニーから弱化型HDを産生するものを選択する。弱化型HD変異株は、最小培地で生育することができ、L-メチオニン及びL-スレオニンを過剰に加えた最小培地では生育できないが、L-ホモセリン、又はL-メチオニン及びL-スレオニンを加えた最小培地では生育できるので、これを指標に選択することができる (Shio, I. & Sano, K., J. G. A. M., 15, 267-287 (1969))。こうして得られた変異株が弱化型HDを生産することを確認するために、菌体から粗酵素液を抽出してHD比活性を野生型HDと比較しておくことが好ましい。

HDの酵素活性は、例えばFollettieらの方法 (Follettie, M. T. et al., Molecular Microbiology 2, 53-62 (1988)) に従って菌体より調製した粗酵素液を用いて、Kalinowskiらの方法 (Kalinowski, J. et al., Mol. Gen. Genet., 224, 317

-324 (1990)) によって測定することができる。

得られた弱化型HD変異株から変異型HD遺伝子を単離するには、例えば、弱化型HD変異株から斎藤、三浦の方法 (H. Saito and K. Miura Biochem. Biophys. Acta 72, 619, (1963)) 等により染色体DNAを調製し、ポリメラーゼチェーンリアクション法 (PCR: polymerase chain reaction; White, T. J. et al; Trends Genet. 5, 185(1989)参照) により、HD遺伝子を増幅することによって行うことができる。増幅反応に用いるDNAプライマーは、HD遺伝子の全領域あるいは一部領域を含有するDNA二重鎖の両3'末端に相補するものを用いる。HD遺伝子の一部領域だけを増幅した場合には、該DNA断片をプライマーとして全領域を含むDNA断片を染色体DNAライブラリーよりスクリーニングする必要がある。HD遺伝子の全領域を増幅した場合には、増幅されたHD遺伝子を含有するDNA断片を含むPCR反応液をアガロースゲル電気泳動に供した後、目的のDNA断片を抽出することによってHD遺伝子を含有するDNA断片を回収できる。

DNAプライマーとしては、例えばコリネホルム・グルタミカムについて既知となっている配列 (Peoples, O. P. et al; Molecular Microbiology, 2(1), 63-72 (1988)) を基にして適宜作成すればよいが、具体的には、HD遺伝子をコードする1150塩基からなる領域を増幅できるプライマーが好ましく、例えば配列番号1及び2に示した2種のプライマーが適当である。プライマーDNAの合成は、ホスホアミダイト法 (Tetrahedron Letters, 22, 1859(1981)参照) 等の常法により、市販のDNA合成装置 (例えば、Applied Biosystems社製DNA合成機 model 380B等) を用いて合成することができる。また、PCR反応は、市販のPCR反応装置 (宝酒造 (株) 製DNAサーマルサイクラー PJ2000型等) を使用し、TaqDNAポリメラーゼ (宝酒造 (株) より供給されている) を用い、供給者により指定された方法に従って行うことができる。

PCR法により増幅された変異型HD遺伝子は、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli: 以下、「E. coli」ともいう) 及び/又はコリネホルム細菌の細胞内において自律複製可能なベクターDNAに接続して組換えDNAを調製し、これをE. coli細胞に導入しておく、後の操作がしやすくなる。E. coli細胞内にお



いて自律複製可能なベクターとしては、プラスミドベクターが好ましく、宿主の細胞内で自立複製可能なものが好ましく、例えば pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG399、pHSG398、RSF1010等が挙げられる。

また、これらのベクターにコリネホルム細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力をもつDNA断片（例えば、pAM 330（特開昭58-67699号公報参照）、pHM 1519（特開昭58-77895号公報参照）、pCG 1（特開昭57-134500号公報参照）、pCG 2（特開昭58-35197号公報参照）、pCG 4（特開昭57-183799号公報参照）、pCG 11（特開昭57-183799号公報参照）等から調製できる）を挿入すると、*E. coli*及びコリネホルム細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。

このようなシャトルベクターとしては、以下のものが挙げられる。尚、それぞれのベクターを保持する微生物及び国際寄託機関の寄託番号をカッコ内に示した。

- pAJ655    *エシェリチア・コリ*AJ11882(FERM BP-136)  
          *コリネバクテリウム・ゲルタミク*SR8201(ATCC39135)
- pAJ1844   *エシェリチア・コリ*AJ11883(FERM BP-137)  
          *コリネバクテリウム・ゲルタミク*SR8202(ATCC39136)
- pAJ611    *エシェリチア・コリ*AJ11884(FERM BP-138)
- pAJ3148   *コリネバクテリウム・ゲルタミク*SR8203(ATCC39137)
- pAJ440    *バチルス・スブチリス*AJ11901(FERM BP-140)

これらのベクターは、寄託微生物から次のようにして得られる。対数増殖期に集められた細胞をリゾチーム及びSDSを用いて溶菌し、 $30000 \times g$ で遠心分離して溶解物から得た上澄液にポリエチレングリコールを添加し、セシウムクロライド-エチジウムブロマイド平衡密度勾配遠心分離により分別精製する。

*E. coli*にプラスミドを導入して形質転換するには D. M. Morrisonの方法（Methods in Enzymology, 68, 326, 1979）あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法（Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159(1970)）等により行うことができる。

弱化型HD変異株から変異型HD遺伝子を単離するには、弱化型HD変異株か

らプラスミドベクター等を用いて染色体DNAライブラリーを作製し、このライブラリーから変異型HD遺伝子を保持する株を選択し、選択された株から変異型HD遺伝子が挿入された組換えDNAを回収することによっても得られる。以下に、染色体ライブラリーの調製及びライブラリーから変異型HD遺伝子を保持する株を選択する方法の一例について述べる。

まず、弱化型HD変異株を培養して培養物を得る。用いる培地はコリネホルム細菌が生育できるものであればよく、培地中のL-スレオニン及びL-メチオニンの含有量が少ない場合には、L-スレオニン及びL-メチオニンあるいはL-ホモセリンを添加しておくことが好ましい。次に培養物を遠心分離して菌体を得、この菌体より、例えば斎藤、三浦の方法 (Biochem. Biophys. Acta., 72, 619, (1963))、K. S. Kirbyの方法 (Biochem. J., 64, 405, (1956)) 等の方法により染色体DNAを得る。

こうして得られた染色体DNAから変異型HD遺伝子を単離するために、染色体DNAライブラリーを作製する。まず、染色体DNAを適当な制限酵素で部分分解して種々の断片混合物を得る。切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。例えば、Sau3AIを、温度30℃以上、好ましくは37℃、酵素濃度1～10ユニット/mlで様々な時間(1分～2時間)染色体DNAに作用させてこれを消化する。

ついで、切断された染色体DNA断片を、E. coli細胞内で自律複製可能なベクターDNAに連結し、組換えDNAを作製する。具体的には、染色体DNAの切断に用いた制限酵素 Sau3AIと同一末端塩基配列を生じさせる制限酵素、例えばBamHIを、温度30℃以上、酵素濃度1～100ユニット/mlの条件下で1時間以上、好ましくは1～3時間、ベクターDNAに作用させてこれを完全消化し、切断開裂する。次いで、上記のようにして得た染色体DNA断片混合物と開裂切断されたベクターDNAを混合し、これにDNAリガーゼ、好ましくはT4DNAリガーゼを、温度4～16℃、酵素濃度1～100ユニット/mlの条件下で1時間以上、好ましくは6～24時間作用させて組換えDNAを得る。

得られた組換えDNAを用いて、例えばE. coli K-12株を形質転換して染色体DNAライブラリーを作製する。この形質転換は D. M. Morrisonの方法 (Methods

in Enzymology, 68, 326, 1979)あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol., Biol., 53, 159(1970))等により行うことができる。

得られた染色体DNAライブラリーの中から、変異型HD遺伝子を保持する形質転換株を選択するには、例えばコリネバクテリウム・グルタミカムについて既知となっている配列(Peoples, O. P. et al., Molecular Microbiology, 2(1), 63-72(1988))をもとにしてオリゴヌクレオチドプローブを合成し、これを用いたコロニーハイブリダイゼーションを行えばよい。E. coliのHD遺伝子は2種類(HD-1、HD-2)存在することが知られている(Zakin, M. M. et al; J.B.C., 258, 3028-3031(1983))が、これらはいずれもコリネバクテリウム・グルタミカムHDのC末端側約100アミノ酸残基に対応する領域が存在しないので、この領域の中からプローブに用いる配列を選択すると、E. coli染色体上のHD遺伝子にはハイブリダイズしないので好ましい。こうして選択された形質転換株から、変異型HD遺伝子を含有する組換えDNAを、例えばP. Guerryらの方法(J. Bacteriol., 116, 1064, (1973))、D. B. Clewellの方法(J. Bacteriol., 110, 667, (1972))などにより単離することができる。

また、上記と同様にしてコリネホルム細菌からクローニングされた野生型HD遺伝子を用いて、以下のようにして弱化型HDを生産する株を創成してもよい。まず、野生型HD遺伝子又は他の変異を有するHD遺伝子を含有するDNAをインビトロ変異処理し、変異処理後のDNAと宿主に適合するベクターDNAとを連結して組換えDNAを得る。組換えDNAを宿主微生物に導入して形質転換体を得、同形質転換体のうちで弱化型HDを発現するように至ったものを選択する。また、野生型HD遺伝子又は他の変異を有するHD遺伝子を含有するDNAを、宿主に適合するベクターDNAと連結して組換えDNAを得て、その後組換えDNAをインビトロ変異処理し、変異処理後の組換えDNAを宿主微生物に導入して形質転換体を得、同形質転換体のうちで弱化型HDを発現するように至ったものを選択してもよい。

DNAをインビトロ変異処理するための薬剤としては、ヒドロキシルアミン等が挙げられる。ヒドロキシルアミンは、シトシンをN<sup>4</sup>-ヒドロキシシトシンに変

えることによりシトシンからチミンへの変異を起こす化学変異処理剤である。

本発明に用いる変異型HD遺伝子としては、弱化型HDをコードするものであれば特に制限されないが、野生型HDのアミノ酸配列において、

①N末端から23番目のロイシン残基がロイシン残基以外のアミノ酸残基に変化する変異、

②N末端から104番目のバリン残基がバリン残基以外のアミノ酸残基に変化する変異、

③N末端から23番目のロイシン残基がロイシン残基以外のアミノ酸残基に変化し、かつ、104番目のバリン残基がバリン残基以外のアミノ酸残基に変化する変異、

のいずれかの変異を有するHDをコードする遺伝子が挙げられる。ここで、野生型HDのアミノ酸配列としては、具体的には配列表配列番号3及び4に示すプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム野生株由来のHDのアミノ酸配列が挙げられる。

上記①～③に示した変異において、23番目のロイシン残基にあってはフェニルアラニン残基に変化する変異が、104番目のバリン残基にあってはイソロイシン残基に変化する変異が挙げられる。

尚、置換されたアミノ酸残基に対応するコドン、そのアミノ酸残基をコードするものであれば種類は特に問わない。また、菌種や菌株の違いにより保持する野生型HDのアミノ酸配列がわずかに相異なるものがある。このような酵素の活性に関与しない位置でのアミノ酸残基の置換、欠失あるいは挿入を有するHDも本発明に使用することができる。

例えば、後記実施例に示すように、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム 2256株(ATCC 13869)に由来するHDのアミノ酸配列を、コリネバクテリウム・グルタミカムのHDについて報告されているアミノ酸配列(Peoples, O. P. et al; Molecular Microbiology 2(1) 63-72 (1988))と比較したところ、N末端から148番目のアミノ酸残基はコリネバクテリウム・グルタミカムのHDではグリシン残基であるのに対し、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムHDではアラニン残基であることが明らかとなっている。このようなコリネバク

テリウム・グルタミカムのHDにおいても、上記①～③のいずれかの変異を導入すると弱化型HDが得られることが予想される。

### < 2 > 野生型 A K 遺伝子及び変異型 A K 遺伝子の取得

本発明に用いる野生型 A K 遺伝子は、コリネホルム細菌野生株から調製することができる。また、L-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除された A K をコードする遺伝子は、A K 活性に対する L-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除された変異株から調製することができる。このような変異株は、例えば、コリネホルム細菌野生株に、通常の変異処理法、紫外線照射または N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 等の変異剤処理を施し、変異処理した細胞群の中から取得することができる。A K 活性の測定は、Miyajima, R et al; The Journal of Biochemistry(1968), 63(2), 139-148 に記載される方法を用いることができる。

A K 遺伝子の供与菌としては、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメントム野生株 ATCC13869、及び ATCC13869 株より変異処理により誘導された L-リジン生産菌 AJ3463 (FERM P-1987) が最も好ましい供与菌である。

コリネホルム細菌から A K 遺伝子を単離するには、例えば、斎藤、三浦の方法 (H. Saito and K. Miura Biochem. Biophys. Acta, 72, 619, (1963)) 等により染色体 DNA を調製し、ポリメラーゼチェインリアクション法 (PCR: polymerase chain reaction; White, T. J. et al; Trends Genet. 5, 185(1989) 参照) により、A K 遺伝子を増幅することによって行うことができる。

増幅に用いる DNA プライマーは A K 遺伝子の全領域あるいは一部領域を含有する DNA 二重鎖の両 3' 末端に相補するものを用いる。A K 遺伝子の一部領域だけを増幅した場合には、該領域の DNA 断片をプライマーとして用い、全領域を含む DNA 断片を増幅することにより遺伝子ライブラリーよりスクリーニングする必要がある。全領域を増幅した場合には、該 DNA 断片をアガロースゲル電気泳動に供した後、目的のバンドを切り出すことによって A K 遺伝子を含有する DNA 断片を回収できる。

DNAプライマーとしては、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっている配列 (Molecular Microbiology(1991), 5(5), 1197-1204, Mol. Gen. Genet. (1990)224, 317-324参照) を基にして、AK遺伝子をコードする約1643bpの領域を増幅すべく、5'-TCGCGAAGTAGCACCTGTCACTT-3' (配列表配列番号5) と5'-ACGGAATTCAATCTTACGGCC-3' (配列表配列番号6) という配列の23mer及び21merの一本鎖DNAが最適である。DNAの合成はApplied Biosystems社製DNA合成機 model 380Bを使用し、ホスホアミダイト法を用いて (Tetrahedron Letters(1981), 22, 1859参照) 常法に従って合成できる。PCR反応は、宝酒造 (株) 製DNAサーマルサイクラー PJ2000型を用い、TaqDNAポリメラーゼを用い、供給者により指定された方法に従って行うことができる。

PCR法により増幅された変異型AK遺伝子は、E. coli及び／又はコリネホルム細菌の細胞内において自律複製可能なベクターDNAに接続して組換えDNAを調製し、これをE. coli細胞に導入しておく、後の操作がしやすくなる。E. coli細胞内において自律複製可能なベクターとしては、プラスミドベクターが好ましく、宿主の細胞内で自立複製可能なものが好ましく、例えば pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG399、pHSG398、RSF1010等が挙げられる。

また、これらのベクターにコリネホルム細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力をもつDNA断片を挿入すると、E. coli及びコリネホルム細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。E. coliにプラスミドを導入して形質転換するには D. M. Morrisonの方法 (Methods in Enzymology, 68, 326, 1979) あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol., Biol., 53, 159(1970)) 等により行うことができる。

上記のようにしてAK野生株からAK遺伝子を単離すれば野生型AK遺伝子が得られ、AK変異株からAK遺伝子を単離すれば変異型AK遺伝子が得られる。

本発明に用いる変異型AK遺伝子としては、L-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が解除されたAKをコードするものであれば特に制限されないが、野生型AKのアミノ酸配列において、 $\alpha$ サブユニットではN末端から279番目のアラニン残基がアラニン以外かつ酸性アミノ酸以外のアミ

ノ酸残基に、 $\beta$ サブユニットでは30番目のアラニン残基がアラニン以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化する変異が挙げられる。ここで、野生型AKのアミノ酸配列としては、具体的には $\alpha$ サブユニットでは配列表配列番号10に示すアミノ酸配列が、 $\beta$ サブユニットでは配列表配列番号12に示すアミノ酸配列が挙げられる。

また、上記のアラニン以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基としては、スレオニン残基、アルギニン残基、システイン残基、フェニルアラニン残基、プロリン残基、セリン残基、チロシン残基及びバリン残基が挙げられる。

尚、置換されるアミノ酸残基に対応するコドンは、そのアミノ酸残基をコードするものであれば種類は特に問わない。また、菌種や菌株の違いにより保持する野生型AKのアミノ酸配列がわずかに相異なるものがあると予想される。このような酵素の活性に関与しない位置でのアミノ酸残基の置換、欠失あるいは挿入を有するAKも本発明に使用することができる。

### < 3 > HD変異株及びHD欠損株の取得

HD変異株は、< 1 >に記載したように、野生型HDを生産するコリネホルム細菌を紫外線照射または変異剤による処理を行い、変異処理した菌体から変異型HDを産生する株を選択することによって得られる。また、そのようにして得られたHD変異株から単離した変異型HD遺伝子を、野生型コリネホルム細菌細胞に導入し、染色体上のHD遺伝子との相同組換えにより遺伝子置換を行うことによって、野生型HDを発現しないHD変異株が得られる。

変異型HD遺伝子を、宿主染色体上のHD遺伝子と置換するには以下のようにすればよい（図1参照）。すなわち、プラスミドベクターにプレバクテリウム・ラクトファーマンタム由来の温度感受性複製起点と変異型HD遺伝子とクロラムフェニコール等の薬剤に耐性を示すマーカー遺伝子とを挿入して組換えDNAを調製し、この組換えDNAでコリネホルム細菌を形質転換し、温度感受性複製起点が機能しない温度で形質転換株を培養し、続いてこれを薬剤を含む培地で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換株が得られる。

こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にもともと存在するHD遺伝子配列との組換えを起こし、染色体HD遺伝子と変異型HD遺伝子との融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分（ベクター部分、温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカー）を挟んだ状態で染色体に挿入されている。したがって、この状態では野生型HDが優性であるので、最小培地で野生株と同等の生育を示す。

次に、染色体DNA上に変異型HD遺伝子のみを残すために、2個のHD遺伝子の組換えにより1コピーのHD遺伝子を、ベクター部分（温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカーを含む）とともに脱落させる。例えば、染色体組込み株を培養し、培養菌体を薬剤を含まない平板培地にまいて培養する。生育したコロニーを、薬剤を含む平板培地にレプリカして培養し、薬剤感受性株を取得する。得られた薬剤感受性株の染色体からベクター部分が脱落していることを、サザン・ハイブリダイゼーションにより確認し、さらに変異型HDを発現していることを確認する。

上記の変異型HD遺伝子のかわりに、HDの一部をコードするHD遺伝子、すなわち一部を欠失したHD遺伝子を用いて遺伝子置換を行うと、染色体HD遺伝子が一部を欠失したHD遺伝子に置換されたHD欠損株が得られる。

後記実施例1に示すように、HDはN末端側の領域が活性に関与していると予想される。したがって、HD遺伝子のうち欠失させる部位としては、N末端側の領域、例えばN末端から350アミノ酸以内の領域、例えば100～200番目、あるいは250～350番目のアミノ酸の領域が挙げられる。尚、HD遺伝子は、その下流に存在するホモセリンキナーゼと同一オペロン内にあるので、ホモセリンキナーゼの発現を阻害しないようにHD遺伝子のプロモーター部位は欠失させないことが好ましい。

組換えDNAをコリネホルム細菌の細胞内に導入するには、E. coli K-12 について報告されている様に受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法（Mandel, M. and Higa, A., J. Mol., Biol., 53, 159(1970)、またはバチルス・ズブチリスについて報告されている様に細胞がDNAを取り込み得る様に増殖段階（いわゆるコンピテントセル）に導入する方法（Duncan, C. H., Wilson, G. A.



and Young, F. E., Gene, 1, 153(1977)) により可能である。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類および酵母について知られている様に (Chang, S. and Choen, S. N., Molec. Gen. Genet., 168, 111(1979); Bibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A., Nature, 274, 398(1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929(1978))、DNA 受容菌を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストにして組換えDNA受容菌に導入することも可能である。

プロトプラスト法では上記のバチルス・ズブチリスにおいて使用されている方法でも充分高い頻度を得ることができるし、特開昭57-183799に記載されたコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属のプロトプラストにポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールと二価金属イオンとの存在下にDNAをとり込ませる方法も当然利用できる。ポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールの代りに、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、フィコール、ブルロニックF 68 (セルバ社) などの添加によってDNAのとり込みを促進させる方法でも同等の結果が得られる。

さらには、電気パルス法 (杉本ら, 特開平2-207791号公報) によっても、組換えDNAをブレビバクテリウム属またはコリネバクテリウム属細菌に属する受容菌へ導入できる。

変異型HD遺伝子または欠失型HD遺伝子を導入する野生型コリネホルム細菌としては、コリネバクテリウム属細菌、及び従来ブレビバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合されたブレビバクテリウム属細菌、さらにコリネバクテリウム属細菌と非常に近縁なブレビバクテリウム属細菌が挙げられるが、特にコリネバクテリウム属 (ブレビバクテリウム属) のグルタミン酸生産性細菌が本発明においては、最も好ましいものである。コリネバクテリウム属 (ブレビバクテリウム属) のグルタミン酸生産性細菌の野生株の例としては次のようなものが挙げられ、これらの野生株、あるいは同株にL-リジン生産性の性質を付与した株も同様に本発明に使用することができる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	ATCC 13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム	ATCC 15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC 15991
コリネバクテリウム・グルタミカム	ATCC 13032
	ATCC 13060
ブレビバクテリウム・ディバリカタム	ATCC 14020
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム	ATCC 13869
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC 15990
コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC 17965
ブレビバクテリウム・サッカロリディウム	ATCC 14066
ブレビバクテリウム・インマリオフィウム	ATCC 14068
ブレビバクテリウム・ロゼウム	ATCC 13825
ブレビバクテリウム・フラバム	ATCC 13826
ブレビバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC 19240
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム	ATCC 15354

また、本発明に用いることができるコリネホルム細菌として、上記のようなグルタミン酸生産性を有する野性株のほかにグルタミン酸生産性を有するまたはグルタミン酸生産性を失った変異株も含まれる。現在、L-リジン生産菌としてコリネホルム・グルタミン酸生産菌の種々の人工変異株が用いられており、これらの株も本発明に使用することができる。このような人工変異株としては次のようなものがある。AEC (S-(2-アミノエチル)-システイン) 耐性変異株、その成長にL-ホモセリンのようなアミノ酸を必要とする変異株 (特公昭48-28078号, 特公昭56-6499号), AECに耐性を示し、更にL-ロイシン、L-ホモセリン, L-プロリン, L-セリン, L-アルギニン, L-アラニン, L-バリン等のアミノ酸を要求する変異株 (米国特許第3708395号及び第3825472号), DL- $\alpha$ -アミノ- $\epsilon$ -カプロラクタム,  $\alpha$ -アミノ- $\gamma$ -グルタリルラクタム, アスパラギン酸-アナログ, スルファ剤, キノイド, N

ーラウロイルロイシンに耐性を示すＬーリジン生産変異株、オキザロ酢酸脱炭酸酵素（デカルボキシラーゼ）または呼吸系酵素阻害剤に耐性を示すＬーリジン生産変異株（特開昭５０－５３５８８号，特開昭５０－３１０９３号，特開昭５２－１０２４９８号，特開昭５３－９３９４号，特開昭５３－８６０８９号特開昭５５－９７８３号，特開昭５５－９７５９号，特開昭５６－３２９９５号，特開昭５６－３９７７８号，特公昭５３－４３５９１号，特公昭５３－１８３３号），イノシトールまたは酢酸を要求するＬーリジン生産変異株（特開昭５５－９７８４号，特開昭５６－８６９２号），フルオロピルビン酸または３４℃以上の温度に対して感受性を示すＬーリジン生産変異株（特開昭５５－９７８３号，特開昭５３－８６０９０号）、エチレングリコールに耐性を示し、Ｌーリジンを生産するブレビバクテリウムまたはコリネバクテリウムの変異株（米国特許出願第３３３４５５号参照）。

#### < 4 > HD変異株又はHD欠損株におけるAK遺伝子増幅

AKは、Ｌーリジン及びＬースレオニンが共存することによってフィードバック阻害を受けるが、野生型ホモセリンデヒドロゲナーゼを発現しないコリネホルム細菌はＬースレオニンを生産できないので、AKはフィードバック阻害を受けない。したがって、野生型ホモセリンデヒドロゲナーゼを発現しないコリネホルム細菌の細胞中でAK遺伝子を増幅すれば、Ｌーリジン生産性が向上すると考えられる。また増幅するAK遺伝子として阻害解除型AK遺伝子を用いると、一層フィードバック阻害を受けないので、さらにＬーリジン生産性が向上すると考えられる。

AK遺伝子を導入する野生型ホモセリンデヒドロゲナーゼを発現しないコリネホルム細菌としては、上記< 3 >のようにして得られるHD変異株又はHD欠損株が挙げられるが、突然変異処理によって得られるHD完全欠損株を用いても、同様にAK遺伝子増幅によるＬーリジン生産性向上効果が得られる。

これらの野生型ホモセリンデヒドロゲナーゼを発現しないコリネホルム細菌細胞中でAK遺伝子または変異型AK遺伝子を増幅するには、AK遺伝子または変異型AK遺伝子とコリネホルム細菌細胞内で自律複製可能なベクターとからなる

組換えDNAで該コリネホルム細菌を形質転換すればよい。

ここで用いるベクターは、コリネホルム細菌細胞内において自律的に複製し得るものであればどのようなものでも良い。具体的には、前述したpAJ655、pAJ1844、pAJ611、pAJ3148、pAJ440等が例示できる。

コリネホルム細菌の形質転換方法としては、E. coli K-12 について報告されている様に受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol., Biol., 53, 159(1970)、またはバチルス・ズブチリスについて報告されている様に細胞がDNAを取り込み得る様に増殖段階（いわゆるコンピテントセル）に導入する方法 (Duncan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., Gene, 1, 153(1977)) 等が挙げられる。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類および酵母について知られている様に (Chang, S. and Choen, S. N., Molec. Gen., Genet., 168, 111(1979); Bibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929 (1978))、DNA 受容菌を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストにして組換えDNA受容菌に導入することも可能である。

また、ベクターに薬剤耐性などのマーカー遺伝子や、宿主の栄養要求性を相補する遺伝子などを保持させることにより、組換えDNAの宿主中での安定性を向上させることができる。

さらに、AK遺伝子または変異型AK遺伝子の発現には、AK遺伝子固有のプロモーターをそのまま用いてもよいが、コリネホルム細菌で機能する他の遺伝子のプロモーターを用い、これをAKまたは変異型AKをコードするDNA配列に連結してもよい。

#### < 5 > HD変異株又はHD欠損株の染色体DNAへの変異型AK遺伝子の導入

上記< 4 >で述べたように、HD変異株又はHD欠損株の細胞中でAK遺伝子増幅を行うと、L-リジン生産性を向上させることができるが、HD変異株又はHD欠損株に導入したAK遺伝子の安定性を増すためには、AK遺伝子を染色体DNA中に組み込むことが好ましい。ここで染色体DNAに組み込むAK遺伝子としては、変異型AK遺伝子を用いることが好ましい。

変異型 A K 遺伝子を、宿主染色体 D N A に組み込むには、変異型 H D 遺伝子あるいは欠失型 H D 遺伝子の場合と同様に遺伝子組込みを行えばよい。すなわち、プラスミドベクターにブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム由来の温度感受性複製起点と変異型 A K 遺伝子とクロラムフェニコール等の薬剤に耐性を示すマーカー遺伝子とを挿入して組換え D N A を調製し、この組換え D N A でコリネホルム細菌を形質転換し、温度感受性複製起点が機能しない温度で形質転換株を培養し、続いてこれを薬剤を含む培地で培養することにより、組換え D N A が染色体 D N A に組み込まれた形質転換株が得られる。

こうして染色体に組換え D N A が組み込まれた株は、染色体上にもともと存在する A K 遺伝子配列との組換えを起こし、染色体 A K 遺伝子と変異型 A K 遺伝子との融合遺伝子 2 個が組換え D N A の他の部分（ベクター部分、温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカー）を挟んだ状態で染色体に挿入されている。この状態では変異型 A K が優性であるので表現型は変異型となる。したがって、遺伝子組込み株のままでよいが、染色体 D N A 上ではほぼ同一の配列が並列に並んでいると再び組換えを起こして一方の A K 遺伝子が脱落しやすいので、染色体 D N A 上に変異型 A K 遺伝子のみが残った遺伝子置換株を得ることが好ましい。すなわち、2 個の A K 遺伝子の組換えにより、1 コピーの A K 遺伝子をベクター部分（温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカーを含む）とともに脱落させる。例えば、染色体組込み株を培養し、培養菌体を薬剤を含まない平板培地にまいて培養する。生育したコロニーを、薬剤を含む平板培地にレプリカして培養し、薬剤感受性株を取得する。得られた薬剤感受性株の染色体からベクター部分が脱落していることを、サザン・ハイブリダイゼーションにより確認し、さらに変異型 A K を発現していることを確認する。

尚、変異型 H D 遺伝子または欠失型 H D 遺伝子による遺伝子置換の場合と異なり、野生型 A K 遺伝子が染色体 D N A 上に完全な形で残っていてもさしつかえないので、変異型 A K 遺伝子は染色体 D N A 上の A K 遺伝子以外の部位に組み込まれていてもよい。

#### < 6 > L - リジンの製造

上記のようにして得られるHD変異株、HD欠損株、AK遺伝子を増幅したこれらの株、または変異型AK遺伝子を組み込んだHD変異株もしくはHD欠損株を、好適な培地で培養することにより、培養物中にL-リジンを生産蓄積せしめることができる。

使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地が挙げられる。

炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースやでんぷんの加水分解物などの糖類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

有機微量栄養源としては、ビタミンB<sub>1</sub>、L-ホモセリンなどの要求物質または酵母エキスを適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じてリン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

また、HD欠損株を用いる場合には、培地中に適当量のL-スレオニン及びL-メチオニン、またはL-ホモセリンを加える。

培養は好氣的条件下で16～72時間実施するのがよく、培養温度は25℃～37℃に、培養中pHは5～7に制御することが好ましい。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。培養物からのL-リジンの採取は通常のイオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、遺伝子組込み及び遺伝子置換の概念図、

図2は、各種微生物のHD遺伝子のアミノ酸配列を比較した図、

図3は、各種微生物のHD遺伝子のアミノ酸配列を比較した図（続き）、

図 4 は、p399AK9B及びp399AKYBの構築の過程を示す図、

図 5 は、HD 変異株及びHD 欠損株の L-リジン生産性及び培養後の OD を示す図、

図 6 は、AK 遺伝子を増幅したHD 変異株及びHD 欠損株の L-リジン生産性及び培養後の OD を示す図、

図 7 は、変異型 AK 遺伝子が染色体に組み込まれたHD 変異株及びHD 欠損株の L-リジン生産性及び培養後の OD を示す図である。

### 好適な実施例の説明

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

#### 実施例 1 野生型HD 遺伝子、弱化型HD 遺伝子 及び阻害解除型HD 遺伝子の解析

ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム野生株から、弱化型HD 変異株及びL-スレオニンによるフィードバック阻害が解除されたHD を産生する変異株を創成し、これらの野生株及び変異株から、野生型HD 遺伝子、弱化型HD 遺伝子及び阻害解除型HD 遺伝子を単離し、構造解析を行った。野生株としては、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ12036株 (FERM BP-734) を、弱化型HD 変異株としてはブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ12472株及びAJ12937株を、阻害解除型HD 変異株としてはブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム AI6080株を用いた。これらの変異株は以下のようにして得た。

AJ12036株は、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム 2256株 (ATCC 13869) から、もともと存在するプラスミドpAM330を脱落させた株であり、HD に関しては野生型HD を産生する株である。

一方、AJ12472株及びAJ12937株は、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム 2256株 (ATCC 13869) からL-リジン生産性を指標として突然変異による育種を繰り返した結果得られた株であり、弱化型HD を産生する株である。また、AI6080株はブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム 2256株 (ATCC 1386

9) から、L-スレオニン生産性を指標として突然変異による育種を繰り返した結果得られた株であり、阻害解除型HDを産生する株である。

#### < 1 > P C R法によるHD遺伝子の増幅

HD遺伝子の塩基配列は、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいて報告されており (Peoples, O. P. et al; Molecular Microbiology 2(1) 63-72 (1988))、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムとコリネバクテリウム・グルタミカムの各々のHD遺伝子の配列は類似性が高いことが予想されたので、コリネバクテリウム・グルタミカムの配列を基にP C R法に用いる合成プライマーDNAを作製した。

ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ12036株、AJ12472株、AJ12937株及びAI6080株から常法により染色体DNAを調製した。これらの染色体DNAからHD遺伝子を含む約1500bpのDNA断片をP C R法により増幅するために、A B I社製DNA合成機 model381A型を用いて、5'側プライマーH 1 (841)5'-CTGGGAAGGTGAATCGAATT-3' (860): 配列表配列番号1) 及び3'側プライマーH 2 ((2410)5'-TCCGAGGTTTGCAGAAGATC-3' (2391): 配列表配列番号2) の2種類のプライマーを合成した。尚、かっこ内の数字はPeoplesらが発表した塩基配列 (Peoples, O. P. et al., Molecular Microbiology 2(1) 63-72 (1988)) における位置を示す。得られた合成プライマーは、逆相H P L Cにて精製した。

P C R反応は、P C R増幅装置 (DNAサーマルサイクラーPJ2000: 宝酒造 (株)) 及びP C Rキット (Takara GeneAmp<sup>TM</sup> kit: 宝酒造 (株)) を用い、以下に示す組成で行った。



表 1

成 分	濃 度	配 合 量
プライマー H 1	0.25 $\mu$ M	25pmol
プライマー H 2	0.25 $\mu$ M	25pmol
dATP, dGTP, dTTP, dCTP	各々 200 $\mu$ M	20nmol
Taq DNA ポリメラーゼ	2.5U/100 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L (5U/ $\mu$ L)
染色体 DNA		1 $\mu$ g
10 $\times$ 反応緩衝液		10 $\mu$ L
水		バランス (合計量が100 $\mu$ L)

PCR反応におけるDNAの変性、DNAのアニーリング、及びポリメラーゼ反応の条件は、各々94℃、1分、37℃、2分、75℃、3分とし、各温度間の遷移は1秒で行った。この反応サイクルを25サイクル繰返すことによりDNAの増幅を行った。こうして得られた増幅反応生成物の大きさをアガロースゲル電気泳動により確認した結果、約1.4KbpのDNA断片の増幅が認められた。

こうしてAJ12036株、AJ12472株、AJ12937株及びAI6080株の各株の染色体DNAから増幅されたDNA断片を各々制限酵素KpnIを用いて切断して得られるDNA断片を、ベクタープラスミドpHSG399 (Takeshita, S. et al.; Gene(1987), 61, 63-74参照) のKpnI部位に挿入して組換えDNAを得た。AJ12036株由来の増幅断片を含む組換えDNAをpHDW、AJ12472株由来の増幅断片を含む組換えDNAをpHDMI、AJ12937株由来の増幅断片を含む組換えDNAをpHDMII、AI6080株由来の増幅断片を含む組換えDNAをpHDMIIIと命名し、各々のプラスミドをE. coli JM109株に導入して形質転換体を得た。

## < 2 > HD 遺伝子の塩基配列の決定及び変異点の解析

### (1) 野生型及び変異型HD 遺伝子の塩基配列の比較

上記のようにして得られたプレビバクテリウム・ラクトファーマンタムAJ12036株、AJ12472株、AJ12937株及びAI6080株のHD 遺伝子断片の塩基配列の決定をダイデオキシ法により行った。

決定されたAJ12036株の野生型HD 遺伝子の塩基配列及びこの配列から推定され

るアミノ酸配列を、配列表配列番号3に示す。さらに、アミノ酸配列を配列表配列番号4に示す。この配列とPeoplesら報告したコリネバクテリウム・グルタミカムのHD遺伝子の配列 (Peoples, O. P. et al., Molecular Microbiology, 2(1), 63-72 (1988)) を比較したところ、4ヶ所に塩基の相違があり、そのうち1ヶ所はアミノ酸レベルでの相違であった。この相違点をコリネバクテリウム・グルタミカムのHD遺伝子の配列を基準として以下に示す。

①  $^{531}G \rightarrow C$  ( $^{148}Gly \rightarrow ^{148}Ala$ )

②  $^{1222}G \rightarrow C$

③  $^{1318}G \rightarrow T$

④  $^{1324}C \rightarrow G$

コリネホルム細菌の各野生株のHD遺伝子の配列の間に認められるこのような相違は、HD活性に影響するものではなく、コリネバクテリウム・グルタミカムのHD遺伝子の配列も配列番号3に示されるブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタムのHD遺伝子の配列と同等のものとして扱うことができる。

また、AJ12036株の野生型HD遺伝子の塩基配列及びこの配列から推定されるアミノ酸配列をAJ12472株、AJ12937株及びAI6080株のHD遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列と比較した結果、AJ12472株では2ヶ所、AJ12937では1ヶ所、AI6080では1ヶ所の変異点があり、全てアミノ酸置換を伴っており、さらにAJ12472株及びAJ12937株のHD遺伝子には全く同一の変異が1ヶ所共通して存在していることがわかった。各変異点を以下に示す。

表 2

菌 株	塩基配列上の相違点	アミノ酸残基の変異
AJ12472株	$^{155}C \rightarrow T$ , $^{398}G \rightarrow A$	$^{23}Leu \rightarrow Phe$ , $^{104}Val \rightarrow Ile$
AJ12937株	$^{398}G \rightarrow A$	$^{104}Val \rightarrow Ile$
AI6080株	$^{1266}C \rightarrow T$	$^{393}Ser \rightarrow Phe$

以下、 $^{155}\text{C} \rightarrow \text{T}$  ( $^{23}\text{Leu} \rightarrow \text{Phe}$ ) の変異点を変異点 1、 $^{398}\text{G} \rightarrow \text{A}$  ( $^{104}\text{Val} \rightarrow \text{Ile}$ ) の変異点を変異点 2、さらに  $^{1266}\text{C} \rightarrow \text{T}$  ( $^{393}\text{Ser} \rightarrow \text{Phe}$ ) の変異点を変異点 3 という。

## (2) プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム、バチルス・サブチリス及び E. coli の HD アミノ酸配列及び変異点の比較

E. coli には HD 遺伝子が 2 種類 (HD-1、HD-2) 存在し、いずれも AK と 2 機能酵素となっていることが知られている (Zakin, M. M. et al; J. B. C. 258 3028-3031 (1983))。また、バチルス・サブチリスの HD 遺伝子の塩基配列も決定されている (Parsot, C and Cohen, G. N.; J. B. C. 263(29) 14654-14660 (1988))。これらのアミノ酸配列とプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム野生型 HD のアミノ酸配列を比較したものを図 2 及び図 3 に示す。

この結果から、相同性の高い部位は N 末端側の領域に多く、特にプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム HD のアミノ酸配列においてアミノ酸番号 100 ~ 230 の領域に相同性が高い部位が集中していることがわかる。このことと、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム HD の 2 箇所の変異点は N 末端から約 100 アミノ酸残基内にあり、特に変異点 1 は N 末端から 23 アミノ酸残基の位置であって、しかも 2 つの変異点は、E. coli の HD-1、HD-2、バチルス・サブチリスの HD 及びプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム HD との間で保存性の高いアミノ酸残基であったこと、さらに、E. coli の HD-1 及び HD-2 は、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム HD の C 末端側約 100 アミノ酸残基に対応する配列は存在しないことから、HD の活性領域は N-末端側にあると推定される。

一方、L-スレオニンによる阻害が解除されたコリネバクテリウム・ゲルタミカム HD の遺伝子の塩基配列が発表されている。すなわち、Sahm ら (Reinscheid, D. J. et al; J. Bacteriol. 173(10) 3228-3230 (1991)) は点変異による C 末端から 68 番目の 1 アミノ酸の置換を、また Sinskey ら (Archer, J. A. C. et al; Gene 107 53-59 (1991)) は、点変異によるフレームシフトでの C 末端から 17 番目以降のアミノ酸の変化、及び 7 番目以降のアミノ酸の欠失を報告している。ま

た、ブレバクテリウム・ラクトファーメンタムAI6080株の阻害解除型HDでは、アミノ酸残基の変異はC末端から53アミノ酸残基目の位置であった。さらに、*E. coli*のHD-1及びHD-2には存在しないC-末端側の領域が、ブレバクテリウム・ラクトファーメンタムHDと同様にL-スレオニンによるフィードバック阻害を受けるバチルス・サブチリスのHDには存在することから、HDのL-スレオニンによるフィードバック阻害に関わる領域はC-末端側にあると推定される。

## 実施例2 野生型AK遺伝子及び変異型AK遺伝子の取得と解析

### <1>野生型及び変異型AK遺伝子、及びそれらを含むプラスミドの作製

ブレバクテリウム・ラクトファーメンタム 2256株 (ATCC 13869)、及び2256株より変異処理により得られたL-リジン生産性変異株AJ3463 (FERM P-1987) より常法に従い、染色体DNAを調製した。染色体DNAよりPCR法 (polymerase chain reaction; White, T. J. et al; Trends Genet. 5, 185(1989)参照) によりAK遺伝子を増幅した。増幅に用いたDNAプライマーはコリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっている配列 (Molecular Microbiology(1991)5(5), 1197-1204, Mol. Gen. Genet. (1990)224, 317-324参照) を基にしてAK遺伝子をコードする約1643bpの領域を増幅すべく、5'-TCGCGAAGTAGCACCTGTCACTT-3' (配列番号5) と5'-ACGGAATCAATCTTACGGCC-3' (配列番号6) という配列の23mer及び21merの一本鎖DNAを合成した。DNAの合成はApplied Biosystems社製DNA合成機 model 380Bを使用し、ホスホアミダイト法を用いて (Tetrahedron Letters (1981), 22, 1859参照) 常法に従って合成した。

PCR反応は、宝酒造 (株) 製DNAサーマルサイクラー PJ2000型を用い、TaqDNAポリメラーゼを用い、供給者により指定された方法に従って遺伝子増幅を行なった。増幅された1643kbの遺伝子断片をアガロースゲル電気泳動により確認した後、ゲルより切り出した該断片を常法により精製し、制限酵素NruI (宝酒造 (株) 製) 及びEcoRI (宝酒造 (株) 製) にて切断した。

遺伝子断片のクローン化用ベクターにはpHSG399 (Takeshita, S et al; Gene(1987), 61, 63-74参照) を用いた。pHSG399を制限酵素SmaI (宝酒造 (株) 製) 及び

制限酵素EcoRIにて切断し、増幅されたAK遺伝子断片と接続した。DNAの接続はDNAライゲーションキット（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行なった。この様にしてpHSG399にブレヴィバクテリウム染色体より増幅されたAK遺伝子断片が接続されたプラスミドを作製した。野生株である2256株（ATCC 13869）由来のAK遺伝子を有するプラスミドをp399AKY、L-リジン生産菌であるAJ3463由来のAK遺伝子を有するプラスミドをp399AK9と命名した。

p399AKYおよびp399AK9に、それぞれコリネバクテリウム属細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力をもつDNA断片（以下「Coryne. -ori」と記す）を導入し、コリネバクテリウム属細菌中で自律複製可能なAK遺伝子を搭載したプラスミドを作製した。Coryne. -oriは、エシェリヒア・コリと、コリネバクテリウム属細菌の双方の菌体中で自律複製可能なプラスミドベクターからCoryne. -oriを調製した。このようなプラスミドベクターはいくつか報告があるが、ここでは、コリネホルム細菌細胞内で自律複製可能なプラスミドpAJ1844（特開昭58-216199参照）とエシェリヒア・コリ細胞内で自律複製可能なプラスミドpHSG298（S. Takeshita et al : Gene 61, 63-74(1987)参照）から作製したシャトルベクターpHK4を用いた。

pHK4の作製法については、特開平5-7491号公報に詳細に記載されているが、概略を示せば以下の通りである。pAJ1844を制限酵素Sau3AIで部分切断し、制限酵素BamHIで完全切断したpHSG298と連結した。連結後のDNAをブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ12036（FERM-P7559）に導入した。形質転換の方法は、電気パルス法（特開平2-207791参照）を用いた。形質転換体の選択は、カナマイシン25  $\mu$ g/mlを含むM-CM2Gプレート（グルコース5g、ポリペプトン10g、酵母エキス10g、NaCl5g、DL-メチオニン0.2g、寒天15gを純水1lに含む。pH7.2）にて行なった。形質転換体からプラスミドを調製し、大きさの最も小さいものを選択し、pHK4と命名した。このプラスミドは、エシェリヒア・コリと、コリネホルム細菌中で自律複製でき、宿主にカナマイシン耐性を付与する。

上記のようにして得られたpHK4を、制限酵素KpnI（宝酒造（株）製）にて切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit（宝酒造（株）製）を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みBamHIリンカー（宝酒造（株）製）を接続し、pHK4よりCoryne. -ori部分のDNA断片をBamHIのみ

による切断によって切り出される様改変した。このプラスミドをBamHIにより切断し、生じたCoryne. -ori DNA断片を同じくBamHIにて切断したp399AKY、p399AK9に接続し、コリネバクテリウム属細菌中で自律複製可能でかつAK遺伝子を含むプラスミドを作製した。

p399AKY由来の野生型AK遺伝子を含むプラスミドをp399AKYBと命名し、p399AK9由来の変異型AK遺伝子を含むプラスミドをp399AK9Bと命名した。p399AK9B、p399AKYB構築の過程を図4に示す。ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム野生型株であるAJ12036株(FERM-P7559)に変異型AKプラスミドp399AK9Bを導入した株AJ12691は、1992年4月10日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM-P12918として寄託され、1995年2月10日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4999の受託番号で寄託されている。

## < 2 >ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタムの野生型AK及び変異型AK遺伝子の塩基配列の決定

野生型AK遺伝子を含むプラスミドp399AKY及び変異型AK遺伝子を含むプラスミドp399AK9を各々の形質転換体から調製し、野生型及び変異型AK遺伝子の塩基配列の決定を行なった。塩基配列の決定はサンガーらの方法(F. Sanger et al :Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463(1977)などがある)によった。

p399AKYにコードされている野生型AK遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号7に示す。一方、p399AK9にコードされている変異型AK遺伝子の塩基配列は野生型AKと比べ、配列番号7において1051番目のGがAに変化しているという1塩基の変異のみを有していた。AK遺伝子は、同一のDNA鎖に $\alpha$ 、 $\beta$ の2本のサブユニットが同一のリーディングフレームでコードされていることが知られているが(Kalinowski, J et al;Molecular Microbiology(1991)5(5), 1197-1204参照)、相同性から判断して本遺伝子も同一のDNA鎖に $\alpha$ 、 $\beta$ の2本のサブユニットが同一のリーディングフレームでコードされていると考えられる。

DNA塩基配列より推定される野生型AKタンパク質の $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列をDNA配列と同時に配列表の配列番号8に示す。このアミノ酸配列の

みを配列番号 9 に示す。また、DNA 塩基配列より推定される野生型 AK タンパク質の  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列を DNA と同時に配列表の配列番号 10 に示す。このアミノ酸配列のみを配列番号 11 に示す。尚、各サブユニットとも、開始コドンに GTG が用いられており、対応するアミノ酸をメチオニンと表記しているが、これは、メチオニン、バリン、またはフォルミルメチオニンを表すものである。

一方、変異型 AK 遺伝子配列上の変異は、野生型 AK タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 8、10）において、 $\alpha$  サブユニットでは 279 番目のアラニン残基がスレオニン残基に、 $\beta$  サブユニットでは 30 番目のアラニン残基がスレオニン残基にというアミノ酸残基置換を起こしていることを意味する。

### < 3 > 変異型 AK 遺伝子発現産物の AK 活性及び阻害解除の評価

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム（コリネバクテリウム・グルタミカム）野生型株である AJ12036 株（FERM-P7559）に野生型 AK プラスミド p399AKY B 及び変異型 AK プラスミド p399AK9B を各々導入した株を作製した。コリネバクテリウムへの遺伝子導入は、電気パルス法によった。宿主のブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム（コリネバクテリウム・グルタミカム）AJ12036 株、野生型 AK プラスミドを保持する AJ12690 株および、変異型 AK プラスミドを保持する AJ12691（FERM-P12918）株の AK 活性を測定した。活性測定は、常法に従った（Miyajima, R et al; The Journal of Biochemistry(1968)63(2), 139-148 参照）。

表 3 に示す様に AK プラスミド導入により AK の比活性が約 10 ～ 15 倍に増大していること、及び変異型 AK プラスミド導入株についてのみ、L-リジン及び L-スレオニンによる相乗阻害が解除していることを確認した。表 3 は、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム 野生型株 AJ12036 株、及びそれに野生型 AK プラスミドを保持させた AJ12690 株、変異型 AK プラスミドを保持させた AJ12691 株の菌体破碎液の AK 比活性、及びその L-リジン及び L-スレオニンによる相乗阻害の程度を表わしたものである。阻害剤の L-リジン、及び L-スレオニンは各々最終濃度 1 mM となるよう添加した。

表 3

菌株	A K比活性 (mU/mg タンパク)	
	無添加	+1mM L-リジン, +1mM L-スレオニン
AJ12036	19.0	2.6
AJ12690	235.3	34.6
AJ12691	210.5	145.3

#### < 4 > 変異型 A K 遺伝子の部位特異的変異による改良

上記のようにして得られた変異型 A K をさらに改良するために、部位特異的変異により、変異型 A K の変異点 ( $^{270}$ Ala→Thr) を他のアミノ酸残基に置換することにした。目的部位に目的の変異を起こす部位特異的変異法としては P C R を用いる方法(Higuchi, R., 61, in PCR technology (Erlich, H. A. Eds., Stockton press (1989)))、フェージを用いる方法(Kramer, W. and Frits, H. J. Meth. in Enzymol., 154, 350(1987); Kunkel, T. A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367(1987))などがある。

変異によって導入されるアミノ酸残基の種類としては、20種類のアミノ酸を極性や分子構造などの各々の性質により分類し、代表的なもの 8 種(Arg, Asp, Cys, Phe, Pro, Ser, Tyr, Val)を選んだ。各々の変異点のアミノ酸変異、及び塩基置換を表 4 に示す。



表 4

変異名	変異点及びアミノ酸変化					
Th r	279	A l a	G C T	→	Th r	A * C T
A r g	279	A l a	G C T	→	A r g	C * G * T
A s p	279	A l a	G C T	→	A s p	G A * T
C y s	279	A l a	G C T	→	C y s	T * G * T
P h e	279	A l a	G C T	→	P h e	T * T * T
P r o	279	A l a	G C T	→	P r o	C * C T
S e r	279	A l a	G C T	→	S e r	T * C T
T y r	279	A l a	G C T	→	T y r	T * A * T
V a l	279	A l a	G C T	→	V a l	G T * T

変異の導入方法としては、変異が導入される279番目のAla残基のコドンを目的のアミノ酸残基のコドンに置換した23merの合成DNA 8種を考案し(Arg 導入用合成DNAは5'-GCCAGGCGAG CGT GCCAAGGTTT-3' : 配列番号12、Asp 導入用合成DNAは5'-GCCAGGCGAG GAT GCCAAGGTTT-3' : 配列番号13、Cys 導入用合成DNAは5'-GCCAGGCGAG TGT GCCAAGGTTT-3' : 配列番号14、Phe 導入用合成DNAは5'-GCCAGGCGAG TTT GCCAAGGTTT-3' : 配列番号15、Pro 導入用合成DNAは5'-GCCAGGCGAG CCT GCCAAGGTTT-3' : 配列番号16、Ser 導入用合成DNAは5'-GCCAGGCGAG TCT GCCAAGGTTT-3' : 配列番号17、Tyr 導入用合成DNAは5'-GCCAGGCGAG TAT GCCAAGGTTT-3' : 配列番号18、Val 導入用合成DNAは5'-GCCAGGCGAG GTT GCCAAGGTTT-3' : 配列番号19である)、その相補配列と併せて16種類の23mer一本鎖DNAを合成した。

たとえばArg残基を導入する場合、5'-GCCAGGCGAG CGT GCCAAGGTTT-3' (配列番号12) なる配列を有する一本鎖DNA、その相補鎖一本鎖DNA、配列番号5の配列を有する一本鎖DNA、及び配列番号6の配列を有する一本鎖DNAをプライマーとし、p399AKYを鋳型にしてPCR法を行った。非特異的変異の導入を除くため、作製されたDNAから変異点を含む約280塩基対を制限酵素(NaeI-AvaII)を用いて切り出し、p399AKYの該当部位と置換して組換えプラスミドを作製した。置換した領域については塩基配列の確認を行った。

得られた8種類の各々の組換えプラスミドが保持する変異型AKの酵素活性を測定、評価するにあたり、宿主としてE. coliのAK完全欠損株 Gif106M1 を用いた (Boy, E and Patte, J.C., J. Bacteriol. 112, 84-92 (1972), Theze, J. et al., J. Bacteriol. 117, 133-143 (1974))。コリネホルム細菌にはAK欠損株が知られていないために、宿主のAKとプラスミド由来のAKが混在してしまい、正確に測定できないと考えられたためである。多くのコリネホルム細菌の遺伝子はE. coli中で発現することが知られており、またAK遺伝子は pHSG399 上の lac プロモーター下流に連結されているため、エシェリヒア・コリ中で発現可能であると予想された。

野生型及び8種類の組換えプラスミドでE. coli Gif106M1を形質転換し、各々の形質転換株から無細胞抽出液を調製し、酵素解析を行った。AK活性の測定は、Miyajima, R et al; The Journal of Biochemistry (1968) 63(2), 139-148に記載される方法により行った。表5にL-リジン 5mM、L-スレオニン 5mM、あるいはL-リジン及びL-スレオニン 2mMずつ添加したときの阻害解除度及び比活性を示す。

表5

	比活性(mU/mgタンパク)	5mM Lys(%)	5mM Thr(%)	2mM Lys +Thr (%)
AJ12036	5. 6	52. 0	87. 0	7. 0
野生型	316. 4	52. 7	86. 8	6. 2
Thr	374. 4	58. 7	109. 1	78. 3
Arg	197. 4	41. 4	106. 8	58. 6
Cys	267. 0	66. 5	135. 7	60. 6
Phe	447. 7	14. 6	105. 0	32. 4
Pro	125. 0	77. 5	123. 2	85. 2
Ser	406. 8	55. 0	114. 4	37. 0
Tyr	425. 6	16. 1	104. 8	32. 2
Val	448. 9	60. 5	103. 5	75. 5

その結果、Asp のような酸性アミノ酸に変化させた場合はAKは失活したが、

その他のいずれのアミノ酸に変化させた場合もL-リジン及びL-スレオニンによる阻害は解除された。

### 実施例3 HD変異株及びHD欠損株のL-リジン生産性の評価

2種類の変異型HD及びHD欠損がL-リジン生産性に与える効果を比較するために、変異型HD遺伝子又は配列の一部を欠失させたHD遺伝子を同じ宿主の染色体に組込んだ遺伝子置換株を作製し、各々をHD変異株及びHD欠損株としてL-リジン生産性を評価した。

#### <1>変異型HD遺伝子置換用プラスミド及び欠失型HD遺伝子置換用プラスミドの作製

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12036株 (FERM BP-734) (ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム 2256株 (ATCC 13869) から、クリプティックプラスミドpAM330を脱落させたもの) の染色体DNAに、変異型HD遺伝子又は配列の一部を欠失させたHD遺伝子を相同組換えにより導入するために遺伝子置換用プラスミドを作製した。

##### (1) 変異点1を有するHD遺伝子の作製

実施例1で得られた変異型HD遺伝子は、変異点1 ( $^{155}\text{C} \rightarrow \text{T}$  ( $^{23}\text{Leu} \rightarrow \text{Phe}$ )) 及び変異点2 ( $^{308}\text{G} \rightarrow \text{A}$  ( $^{104}\text{Val} \rightarrow \text{Ile}$ )) を有する変異型HD遺伝子 (AJ12472株由来)、及び変異点2のみを有する変異型遺伝子 (AJ12937株由来) の2種類であった。変異点1がHD活性およびL-リジン生産性に与える影響を調べるために、変異点1のみを有する変異型HD遺伝子を作製した。以下、変異点1を有する変異型HDをHD-M1、変異点2を有する変異型HDをHD-M2、変異点1及び変異点2を共に有するHDをHDM-12と呼ぶ。

HDM-12遺伝子を含むプラスミドpHDMIを、変異点1及び変異点2の両変異点の間を切断する制限酵素 TthIII1、及びベクターとHD遺伝子との連結点を切断する KpnI を用いて切断し、変異点1を持つ5'側HD断片を得た。同様に野生型HD遺伝子を有する pHDW を TthIII1及び KpnI で切断して3'側HD断片を得た。こうして得られた5'側HD断片と3'側HD断片とを結合することによって、

変異点1のみを有するHD-M1遺伝子を得た。

## (2) 遺伝子置換用プラスミドの構築

上記のようにして得られた変異点1のみを有するHD-M1遺伝子を、クロラムフェニコール耐性 (Cm<sup>r</sup>) 遺伝子を有するベクタープラスミドpHSG398のKpnI 部位に挿入し、さらに、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム 野生株由来の温度感受性複製起点 (TSori) を pHSG398のBamHI 部位に挿入することによって、HD-M1遺伝子置換用プラスミド pTSHDM1を構築した。TSoriは、Coryne. -oriを有するプラスミドpHK4をインビトロでヒドロキシルアミン処理し、処理後のプラスミドDNAでブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ12036を形質転換し、高温 (34℃) で生育できない形質転換株から回収して得られたプラスミドpHSC4 (特開平5-7491号公報参照) から調製した。尚、Coryne. -oriは、pHSC4からBamHIとKpnIで切り出すことができるが、BamHI切断のみでCoryne. -oriを切り出せるようにプラスミドを改変した。pHSC4を制限酵素KpnI (宝酒造 (株) 製) にて切断し、切断面を平滑末端化した。平滑末端化はDNA Blunting kit (宝酒造 (株) 製) を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みBamHIリンカー (宝酒造 (株) 製) を接続し、pHSC4よりTSori部分のDNA断片をBamHIのみによる切断によって切り出される様改変した。pHSC4を保持するエシェリヒア・コリ AJ12571は、1990年10月11日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-11763 として寄託され、1991年8月26日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-3524 の受託番号で寄託されている。

次に、同様にして、変異点2のみを持つHD-M2遺伝子を有するプラスミド pHDI IをKpnIで切断してHD-M2遺伝子断片を得、これをpHSG398のKpnI 部位に挿入し、さらに、TSori をBamHI 部位に挿入することによりHD-M2遺伝子置換用プラスミド pTSHDM2を構築した。

また、変異点1及び変異点2を共に有するHD-M12遺伝子を有するプラスミド pHDMIをKpnIで切断してHD-M12遺伝子断片を得、これをpHSG398 の KpnI 部位に挿入し、さらに、TSori を BamHI 部位に挿入することによりHD-M12遺伝子置換用プ

ラスミド pTSHDM12を構築した。

さらに、野生型HD遺伝子を有するプラスミド pHDWを AatIIで切断し、HD遺伝子内に存在する2つの AatII 部位（配列番号3において塩基番号716～722、1082～1087）間を欠失させることにより一部を欠失したHD遺伝子（HD-Δ遺伝子）を含むプラスミドを作製した。このプラスミドを KpnIで切断してHD-Δ遺伝子断片を得、これをpHSG398の KpnI 部位に挿入し、次に TSori を BamHI 部位に挿入することによりHD-Δ遺伝子置換用プラスミド pTSHDΔを構築した。

### （3）HD変異株及びHD欠損株の作製

上記で得られた変異型HD遺伝子置換用プラスミド pTSHDM1、pTSHDM2、pTSHDM12、及び欠失型HD遺伝子置換用プラスミドpTSHDΔを用いて、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ12036株の形質転換を、電気パルス法（杉本ら、特開平2-207791号公報）によって行った。

得られた形質転換株を、M-CM2G培地を用いて25℃にてフルグロース（約 $1\sim 2\times 10^9$ /ml）になるまで培養した。培養菌体を、プレート1枚あたり $10^5$ 細胞となるよう希釈し、クロラムフェニコール（5  $\mu$ g/ml）を含むM-CM2G平板培地にまき、34℃にて2～7日培養してコロニーを取得した。得られたコロニーについて、細胞中にプラスミドが含まれていないことを確認し、さらに直鎖状のpHSG398をプローブに用いたサザン・ハイブリダイゼーション解析により、遺伝子置換用プラスミドの染色体への組込みを確認した。

上記のようにして得られた染色体組込み株は、染色体上にもともと存在するHD遺伝子と変異型もしくは欠失型HD遺伝子との融合遺伝子2個が、ベクター（TSoriを含む）を挟んだ状態で挿入されている。

次に、変異型HD遺伝子あるいは欠失型HD遺伝子のみを染色体に残すために、野生型HD遺伝子及びベクターを染色体DNAから脱落させて、変異型HD遺伝子置換株及び欠失型HD遺伝子置換株を得た。野生型HD遺伝子及びベクターの脱落は次のようにして行った。

各組込み株を、クロラムフェニコール（10  $\mu$ g/ml）を含むM-CM2G培地で34℃にてフルグロース（ $1\sim 2\times 10^9$ /ml）になるまで培養した。培養菌体を、クロラムフ

フェニコールを含まないM-CM2G平板培地に1枚あたり50~200コロニーとなるようにまき、34℃にて培養した。生育したコロニーを、クロラムフェニコール(5  $\mu$ g/mL)を含むM-CM2G平板培地にレプリカし、34℃にて培養してクロラムフェニコール感受性株を取得した。得られたクロラムフェニコール感受性株の染色体からベクターが脱落していることを、サザン・ハイブリダイゼーションにより確認し、さらに変異型HDあるいは欠失型HDを発現していることを確認した。こうして得られた遺伝子置換株は、染色体DNAの塩基配列決定により、変異点が導入されていることを確認した。

こうして得られたHD-M1遺伝子置換株をHDM1株、HD-M2遺伝子置換株をHDM2株、HDM-12遺伝子置換株をHDM12株、HD- $\Delta$ 遺伝子置換株をHD $\Delta$ 株と呼ぶ。

#### < 2 > HD変異株及びHD欠損株のL-リジン生産性

HD変異株であるHDM1株、HDM2株、HDM12株、及びHD欠損株であるHD $\Delta$ 株のL-リジン生産性を検討した。シングルコロニーアイソレーションを行ったこれらのHD変異株、HD欠損株及びHDに関しては野生株であるAJ12036株を、下記に示すL-リジン生産培地20mLを入れた500mLフラスコ中で、31.5℃にて72時間振盪培養し、最終OD (OD<sub>660</sub>) 及びL-リジン蓄積量を調べた。

## (L-リジン生産培地)

下記成分(1 L中)を溶解し、KOHでpH 8.0に調製し、115℃で15分殺菌した後、別に乾熱殺菌したCaCO<sub>3</sub>を50 g/L加える。

グルコース	100 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	55 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1 g
d-biotin	500 μg
thiamin-HCl	2000 μg
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
Nicotinamide	5 mg
豆濃 (T-N)	1.05 g
GD113	0.05 ml

結果を図5に示す。尚、残糖はいずれの株でも認められなかった。この結果から明らかなように、L-リジンの蓄積はAJ12036株ではほとんど認められないのに対して、HDM1株では約4 g/l、HDM2株では約17 g/l、HDM12株では約7.5 g/l、HDΔ株では約30 g/lであり、いずれの株でもL-リジンの蓄積が認められ、特にHDΔ株ではL-リジン生産性が飛躍的に向上した。また、HDへの変異点1のみの導入によってもL-リジンが蓄積されることが明らかとなった。

尚、HDΔ株は最小培地またはL-スレオニンもしくはL-メチオニンを単独で添加した最小培地では生育せず、L-ホモセリンまたはL-スレオニン及びL-メチオニンの添加により生育が回復した。また、HDM1株、HDM2株及びHDM12株は、いずれもL-スレオニン及びL-メチオニンを含まない最小培地で生育が可能であった。

尚、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムHDΔ株は、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12846と命名され、1994年3月1日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-14197として寄託され、1995年2月9日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-49

95の受託番号で寄託されている。

#### 実施例 4 HD変異株及びHD欠損株におけるAK遺伝子の増幅効果

実施例 3 に示したように、変異型HD遺伝子及び欠失型HD遺伝子を野生株に導入すると、Lーリジンの生産性が向上することが明らかとなったが、さらにこれらの変異型HD遺伝子及び欠失型HD遺伝子とAK遺伝子増幅との組合せによる効果を調べた。

AKはLーリジン及びLースレオニンによる協奏阻害を受けるが、各々単独では阻害の程度は低いことが知られている。したがって、HD変異株及びHD欠損株ではLースレオニンが生産されないので、野生型AK遺伝子の増幅によってもLーリジンの生産性が向上することが予想される。さらに、実施例 2 で得られたLーリジン及びLースレオニンによる阻害を受けない変異型AKをコードする遺伝子を導入すれば、より一層Lーリジン生産性が向上することが期待される。

このような変異型HD遺伝子あるいは欠失型HD遺伝子の導入とAK遺伝子増幅との組合せ効果を検討するため、実施例 3 で得られたHD変異株及びHD欠損株にAK遺伝子を含むプラスミドを導入し、Lーリジン生産性を評価した。

野生株であるAJ12036、HD変異株であるHDM1、HDM2及びHDM12、及びHD欠損株であるHDΔの各株を各々宿主として、野生型AK遺伝子及びCoryne. -oriを持つプラスミド(p399AKYB)と変異型AKを持つプラスミド(p399AK9B)を用いて形質転換した。すなわち、宿主5株について2種類のプラスミドで形質転換を行い、合計10種類の形質転換株を得た。

AJ12036、HDM1、HDM2、HDM12、HDΔ及び各々の形質転換株について2株ずつを前述のLーリジン生産培地を用いて培養し、Lーリジン生産性を調べた。但し、p399AKYBプラスミド及びp399AK9Bプラスミドを保持する形質転換株については、前培養に用いた培地及びLーリジン生産培地ともに10 µg/mLのクロラムフェニコールを添加して培養した。培養は、培地20mLを入れた500mLフラスコ中で、31.5℃にて72時間振盪しながら行った。

結果を図6に示したように、AJ12036株では、野生型AKプラスミドを導入してもLーリジン生産性の向上は認められないのに対し、HD変異株及びHD欠損株



では、野生型AKプラスミド導入によりL-リジン蓄積量の増加がみられた。また、変異型AKプラスミドを導入した場合には、HD変異株及びHD欠損株のいずれにおいても野生型AKプラスミドを導入したときよりもL-リジン生産性がさらに向上した。さらに、野生型HD遺伝子を保持するAJ12036株でも、変異型AKプラスミドの導入により、約 22 g/L のL-リジン蓄積が認められた。

#### 実施例 5 HD変異株及びHD欠損株における変異型AK遺伝子置換の効果

##### < 1 > 変異型AK遺伝子及び変異型HD遺伝子置換株、及び変異型AK遺伝子及び欠失型HD遺伝子置換株の創成

実施例 4 ではHD変異及びHD欠損とAK遺伝子増幅との組合せの効果を調べたが、本実施例では変異型HD遺伝子あるいは欠失型HD遺伝子が染色体上に組み込まれるとともに変異型AK遺伝子が染色体上に組み込まれた株を創成し、L-リジン生産性を評価した。

変異型AK遺伝子を染色体DNAに組み込むための遺伝子置換用プラスミドは次のようにして得た。

実施例 2 で得られたプラスミドをp399AK9 (pHSG399に染色体より増幅されたブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムAJ3463株由来の変異型AK遺伝子断片が接続されたプラスミド) のベクター部分に存在するBamHI 部位に、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムの温度感受性複製起点 (TSori) を挿入することによって、変異型AK遺伝子置換用プラスミド pAK9Tを構築した。

変異型AK遺伝子及びHD-M1遺伝子が導入された株〔(AK<sup>FBR</sup>+HDM1) 株〕は、実施例 4 で得られたHDM1株を親株として、変異型AK遺伝子置換用プラスミド pAK9Tを用いて変異型AK遺伝子を組み込むことによって得た。HDM1株にpAK9Tを電気パルス法(杉本ら, 特開平2-207791号公報)によって導入し、得られた形質転換株を、M-CM2G培地を用いて25℃にてフルグロース(約1~2×10<sup>9</sup>/ml)になるまで培養した。培養菌体を、プレート1枚あたり10<sup>5</sup>細胞となるよう希釈し、コロラムフェニコール(5 µg/ml)を含むM-CM2G平板培地にまき、34℃にて2~7日培養してコロニーを取得した。得られたコロニーについて、細胞中にプラスミド

が含まれていないことを確認し、さらに直鎖状のpHSG399をプローブに用いたサザン・ハイブリダイゼーション解析により、pAK9Tの染色体への組込みを確認した。

上記のようにして得られた染色体組込み株は、染色体上にもともと存在するAK遺伝子と変異型AK遺伝子との融合遺伝子2個が、ベクター（TSoriを含む）を挟んだ状態で染色体に挿入されている。次に、変異型AK遺伝子のみを染色体DNA上に残すために、野生型AK遺伝子及びベクターを脱落させて、変異型AK遺伝子置換株を得た。ベクターの脱落は次のようにして行った。

変異型AK遺伝子組込み株を、クロラムフェニコール（10  $\mu$ g/mL）を含むM-CM2G培地で34℃にてフルグロース（1~2 $\times 10^9$ /ml）になるまで培養した。培養菌体を、クロラムフェニコールを含まないM-CM2G平板培地に1枚あたり50~200コロニーとなるようにまき、34℃にて培養した。コロニーを形成するクローンのうち、L-リジン生産性が親株であるHDM1株よりも向上している株を選択した。

同様に、変異型AK遺伝子とHD-M12遺伝子を持つ株〔（AK<sup>FBR</sup>+HDM12）株〕は、HDM12株を親株として、pAK9Tを用いた遺伝子置換を上記と同様にして行い、HDM12株よりもL-リジン生産性が向上している株を選択した。

一方、変異型AK遺伝子とHD-M2遺伝子を導入した株〔（AK<sup>FBR</sup>+HDM2）株〕は、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ12036株にpAK9Tを導入して親株として変異型AK遺伝子が導入されたAK<sup>FBR</sup>株を創成し、続いてHD-M2遺伝子の導入を行った。すなわち、AJ12036株にpAK9Tを電気パルス法（杉本ら、特開平2-207791号公報）によって導入し、得られた形質転換株を、M-CM2G培地を用いて25℃にてフルグロース（約1~2 $\times 10^9$ /ml）になるまで培養した。培養菌体を、プレート1枚あたり10<sup>5</sup>細胞となるよう希釈し、クロラムフェニコール（5  $\mu$ g/mL）を含むM-CM2G平板培地にまき、34℃にて2~7日培養してコロニーを取得した。得られたコロニーについて、細胞中にプラスミドが含まれていないことを確認し、さらに直鎖状のpHSG399をプローブに用いたサザン・ハイブリダイゼーション解析により、pAK9Tの染色体への組込みを確認した。

次に、変異型AK遺伝子組込み株を、クロラムフェニコール（10  $\mu$ g/mL）を含むM-CM2G培地で34℃にてフルグロース（1~2 $\times 10^9$ /ml）になるまで培養した。培養菌体を、クロラムフェニコールを含まないM-CM2G平板培地に1枚あたり50~20

0 コロニーとなるようにまき、34℃にて培養した。生育したコロニーを、クロラムフェニコール（5  $\mu$ g/mL）を含むM-CM2G平板培地にレプリカし、34℃にて培養してクロラムフェニコール感受性株を取得した。得られたクロラムフェニコール感受性株の染色体からベクターが脱落していることを、サザン・ハイブリダイゼーションにより確認し、さらに変異型AKを発現していることを確認した。こうして得られた遺伝子置換株は、染色体DNAの塩基配列決定により、変異点が導入されていることを確認した。

こうして得られた変異型AK遺伝子置換株AK<sup>FBR</sup>株の染色体に、HD-M2遺伝子置換用プラスミドpTSHDM2を上記と同様に電気パルス法にて導入し、さらにプラスミドが脱落した遺伝子置換株を得た。遺伝子置換株の選択は、L-リジン生産性の向上及びL-スレオニン又はL-メチオニンに対する感受性により行った。

同様に、変異型AK遺伝子とHD- $\Delta$ 遺伝子を導入した株〔(AK<sup>FBR</sup>+HD $\Delta$ )株〕は、変異型AK遺伝子置換株AK<sup>FBR</sup>株を親株とし、pTSHD $\Delta$ を用いた遺伝子置換を上記と同様にして行い、HD欠損によるL-メチオニン及びL-スレオニン要求性のクローンを選択した。

上記のようにして得られた各遺伝子置換株は、最終的に染色体DNAの塩基配列決定によって変異点が導入されていることを確認し、さらにサザンハイブリダイゼーションによるプラスミド脱落の確認を行った。

#### < 2 > 変異型AK遺伝子及び変異型HD遺伝子置換株、及び変異型AK遺伝子及び欠失型HD遺伝子置換株のL-リジン生産性の評価

上記で得られた4株、すなわち(AK<sup>FBR</sup>+HDM1)株、(AK<sup>FBR</sup>+HDM2)株、(AK<sup>FBR</sup>+HDM12)株、及び(AK<sup>FBR</sup>+HD $\Delta$ )株について、L-リジン生産性の評価を行った。

これらの各株を、前述のL-リジン生産培地20mLを入れた500mLフラスコ中で、31.5℃にて72時間振盪培養し、培養後の培養液のOD及びL-リジン蓄積量を測定した。

結果を図7に示す。L-リジン生産量は、AK<sup>FBR</sup>株が約19 g/Lであったのに対し、(AK<sup>FBR</sup>+HDM1)株では約21 g/L、(AK<sup>FBR</sup>+HDM2)株では約22 g/L、(A

K<sup>FBR</sup>+HDM12) 株では約 20 g/L、(AK<sup>FBR</sup>+HDΔ) 株では約 35 g/L であり、変異型 HD 遺伝子あるいは欠失型 HD 遺伝子を単独で導入した場合よりも、これらの遺伝子と変異型 AK 遺伝子と組み合わせて導入した方が L-リジン生産性がより一層向上することが示された。

培養終了後の培地の OD に関しては、(AK<sup>FBR</sup>+HDM1) 株、(AK<sup>FBR</sup>+HDM2) 株、及び (AK<sup>FBR</sup>+HDM12) 株ではいずれも AK<sup>FBR</sup> 株との差はほとんど無かったが、(AK<sup>FBR</sup>+HDΔ) 株では欠失型 HD 遺伝子単独による遺伝子置換株の場合よりもさらに OD は低下した。尚、培養終了後の残糖はいずれの株においても認められなかった。

(AK<sup>FBR</sup>+HDM2) 株は AJ12848 (FERM P-14198)、(AK<sup>FBR</sup>+HDM12) 株は AJ12849 (FERM P-14199)、及び (AK<sup>FBR</sup>+HDΔ) 株は AJ12850 (FERM P-14200) と命名され、各々かっこ内の受託番号で、1994 年 3 月 1 日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託され、1995 年 2 月 9 日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、それぞれ順に FERM BP-4996、FERM BP-4997、FERM BP-4998 の受託番号で寄託されている。

#### 実施例 6 HD 完全欠失株の復帰変異頻度の測定

染色体上の遺伝子置換により取得した HD の完全欠失株である HDΔ 株及び AK<sup>FBR</sup>+HDΔ 株について、ホモセリン要求性の復帰変異頻度を、通常の変異処理剤である N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) により生菌体を処理して得られた HD 欠損株である ATCC 13287 と比較した。

それぞれの保存菌株を栄養培地にて前培養し、L-リジン生産培地に植菌し、72 時間振盪培養した後に培養液を適宜希釈し、M-CM2G 平板培地にてコロニーを形成させた後、L-メチオニン、L-スレオニンを含まないプレビバクテリアウム用最小培地にレプリカし、最小培地に生育したコロニーの数と、栄養培地に生育したコロニーの数との比率を復帰変異率とした。この方法で復帰変異株のコロニーが観察できない場合には、最小培地に塗布する菌数を増やし、他方栄養培地には希釈したものを塗布し、そのコロニー形成数から最小培地に塗布した菌数を推定し、復帰変異率を算出した。

この方法によって、上記3株の復帰変異率を測定した結果を表6に示す。ATCC13287株では、培養終了時に顕著な復帰変異株の出現を認めたのに対し、染色上の遺伝子置換により作製したHD $\Delta$ 株及びAK<sup>FBR</sup>+HD $\Delta$ 株では復帰変異株が全く認められなかった。また、L-リジン蓄積量は、復帰変異の出現しないHD $\Delta$ 株及びAK<sup>FBR</sup>+HD $\Delta$ 株の方が、ATCC13287株より多かった。

表6

菌 株	復帰変異率 (%)	L-リジン蓄積量(g/l)
ATCC13287	40	20.0
HD $\Delta$	0	30.0
AK <sup>FBR</sup> +HD $\Delta$	0	35.0

- 44 -

## 配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成 DNA

配列

CTGGGAAGGT GAATCGAATT

配列番号 : 2

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成 DNA

配列

TCCGAGGTTT GCAGAAGATC 20

配列番号 : 3

配列の長さ : 1478

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

起源

生物名 : ブレヴィバクテリウム・ラクトフェルメンタム (Brevibacterium lactofermentum)

株名 : AJ12036

配列の特徴

- 45 -

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 89..1423

特徴を決定した方法 : S

## 配列

GGTACCCTTT TTGTTTTGGA CACATGTAGG GTGGCCGAAA CAAAGTAATA GGACAACAAC	60
GCTCGACCGC GATTATTTTT GGAGAATC ATG ACC TCA GCA TCT GCC CCA AGC	112
Met Thr Ser Ala Ser Ala Pro Ser	
1 5	
TTT AAC CCC GGC AAG GGT CCC GGC TCA GCA GTC GGA ATT GCC CTT TTA	160
Phe Asn Pro Gly Lys Gly Pro Gly Ser Ala Val Gly Ile Ala Leu Leu	
10 15 20	
GGA TTC GGA ACA GTC GGC ACT GAG GTG ATG CGT CTG ATG ACC GAG TAC	208
Gly Phe Gly Thr Val Gly Thr Glu Val Met Arg Leu Met Thr Glu Tyr	
25 30 35 40	
GGT GAT GAA CTT GCG CAC CGC ATT GGT GGC CCA CTG GAG GTT CGT GGC	256
Gly Asp Glu Leu Ala His Arg Ile Gly Gly Pro Leu Glu Val Arg Gly	
45 50 55	
ATT GCT GTT TCT GAT ATC TCA AAG CCA CGT GAA GGC GTT GCA CCT GAG	304
Ile Ala Val Ser Asp Ile Ser Lys Pro Arg Glu Gly Val Ala Pro Glu	
60 65 70	
CTG CTC ACT GAG GAC GCT TTT GCA CTC ATC GAG CGC GAG GAT GTT GAC	352
Leu Leu Thr Glu Asp Ala Phe Ala Leu Ile Glu Arg Glu Asp Val Asp	
75 80 85	
ATC GTC GTT GAG GTT ATC GGC GGC ATT GAG TAC CCA CGT GAG GTA GTT	400
Ile Val Val Glu Val Ile Gly Gly Ile Glu Tyr Pro Arg Glu Val Val	
90 95 100	
CTC GCA GCT CTG AAG GCC GGC AAG TCT GTT GTT ACC GCC AAT AAG GCT	448
Leu Ala Ala Leu Lys Ala Gly Lys Ser Val Val Thr Ala Asn Lys Ala	
105 110 115 120	

- 46 -

CTT GTT GCA GCT CAC TCT GCT GAG CTT GCT GAT GCA GCG GAA GCC GCA	496
Leu Val Ala Ala His Ser Ala Glu Leu Ala Asp Ala Ala Glu Ala Ala	
125 130 135	
AAC GTT GAC CTG TAC TTC GAG GCT GCT GTT GCA GCC GCA ATT CCA GTG	544
Asn Val Asp Leu Tyr Phe Glu Ala Ala Val Ala Ala Ala Ile Pro Val	
140 145 150	
GTT GGC CCA CTG CGT CGC TCC CTG GCT GGC GAT CAG ATC CAG TCT GTG	592
Val Gly Pro Leu Arg Arg Ser Leu Ala Gly Asp Gln Ile Gln Ser Val	
155 160 165	
ATG GGC ATC GTT AAC GGC ACC ACC AAC TTC ATC TTG GAC GCC ATG GAT	640
Met Gly Ile Val Asn Gly Thr Thr Asn Phe Ile Leu Asp Ala Met Asp	
170 175 180	
TCC ACC GGC GCT GAC TAT GCA GAT TCT TTG GCT GAG GCA ACT CGT TTG	688
Ser Thr Gly Ala Asp Tyr Ala Asp Ser Leu Ala Glu Ala Thr Arg Leu	
185 190 195 200	
GGT TAC GCC GAA GCT GAT CCA ACT GCA GAC GTC GAA GGC CAT GAC GCC	736
Gly Tyr Ala Glu Ala Asp Pro Thr Ala Asp Val Glu Gly His Asp Ala	
205 210 215	
GCA TCC AAG GCT GCA ATT TTG GCA TCC ATC GCT TTC CAC ACC CGT GTT	784
Ala Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala Ser Ile Ala Phe His Thr Arg Val	
220 225 230	
ACC GCG GAT GAT GTG TAC TGC GAA GGT ATC AGC AAC ATC AGC GCT GCC	832
Thr Ala Asp Asp Val Tyr Cys Glu Gly Ile Ser Asn Ile Ser Ala Ala	
235 240 245	
GAC ATT GAG GCA GCA CAG CAG GCA GGC CAC ACC ATC AAG TTG TTG GCC	880
Asp Ile Glu Ala Ala Gln Gln Ala Gly His Thr Ile Lys Leu Leu Ala	
250 255 260	
ATC TGT GAG AAG TTC ACC AAC AAG GAA GGA AAG TCG GCT ATT TCT GCT	928
Ile Cys Glu Lys Phe Thr Asn Lys Glu Gly Lys Ser Ala Ile Ser Ala	
265 270 275 280	



- 47 -

CGC GTG CAC CCG ACT CTA TTA CCT GTG TCC CAC CCA CTG GCG TCG GTA	976
Arg Val His Pro Thr Leu Leu Pro Val Ser His Pro Leu Ala Ser Val	
285 290 295	
AAC AAG TCC TTT AAT GCA ATC TTT GTT GAA GCA GAA GCA GCT GGT CGC	1024
Asn Lys Ser Phe Asn Ala Ile Phe Val Glu Ala Glu Ala Ala Gly Arg	
300 305 310	
CTG ATG TTC TAC GGA AAC GGT GCA GGT GGC GCG CCA ACC GCG TCT GCT	1072
Leu Met Phe Tyr Gly Asn Gly Ala Gly Gly Ala Pro Thr Ala Ser Ala	
315 320 325	
GTG CTT GGC GAC GTC GTT GGT GCC GCA CGA AAC AAG GTG CAC GGT GGC	1120
Val Leu Gly Asp Val Val Gly Ala Ala Arg Asn Lys Val His Gly Gly	
330 335 340	
CGT GCT CCA GGT GAG TCC ACC TAC GCT AAC CTG CCG ATC GCT GAT TTC	1168
Arg Ala Pro Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asn Leu Pro Ile Ala Asp Phe	
345 350 355 360	
GGT GAG ACC ACC ACT CGT TAC CAC CTC GAC ATG GAT GTG GAA GAT CGC	1216
Gly Glu Thr Thr Thr Arg Tyr His Leu Asp Met Asp Val Glu Asp Arg	
365 370 375	
GTG GGC GTT TTG GCT GAA TTG GCT AGC CTG TTC TCT GAG CAA GGA ATC	1264
Val Gly Val Leu Ala Glu Leu Ala Ser Leu Phe Ser Glu Gln Gly Ile	
380 385 390	
TCC CTG CGT ACA ATC CGA CAG GAA GAG CGC GAT GAT GAT GCA CGT CTG	1312
Ser Leu Arg Thr Ile Arg Gln Glu Glu Arg Asp Asp Asp Ala Arg Leu	
395 400 405	
ATC GTT GTC ACG CAC TCT GCG CTG GAA TCT GAT CTT TCC CGC ACC GTT	1360
Ile Val Val Thr His Ser Ala Leu Glu Ser Asp Leu Ser Arg Thr Val	
410 415 420	
GAA CTG CTG AAG GCT AAG CCT GTT GTT AAG GCA ATC AAC AGT GTG ATC	1408
Glu Leu Leu Lys Ala Lys Pro Val Val Lys Ala Ile Asn Ser Val Ile	
425 430 435 440	

- 48 -

CGC CTC GAA AGG GAC TAATTTTACT GACATGGCAA TTGAACTGAA CGTCGGTCGT 1463

Arg Leu Glu Arg Asp

445

AAGGTTACCG TCACG 1478

配列番号 : 4

配列の長さ : 445

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

Met Thr Ser Ala Ser Ala Pro Ser Phe Asn Pro Gly Lys Gly Pro Gly

1

5

10

15

Ser Ala Val Gly Ile Ala Leu Leu Gly Phe Gly Thr Val Gly Thr Glu

20

25

30

Val Met Arg Leu Met Thr Glu Tyr Gly Asp Glu Leu Ala His Arg Ile

35

40

45

Gly Gly Pro Leu Glu Val Arg Gly Ile Ala Val Ser Asp Ile Ser Lys

50

55

60

Pro Arg Glu Gly Val Ala Pro Glu Leu Leu Thr Glu Asp Ala Phe Ala

65

70

75

80

Leu Ile Glu Arg Glu Asp Val Asp Ile Val Val Glu Val Ile Gly Gly

85

90

95

Ile Glu Tyr Pro Arg Glu Val Val Leu Ala Ala Leu Lys Ala Gly Lys

100

105

110

Ser Val Val Thr Ala Asn Lys Ala Leu Val Ala Ala His Ser Ala Glu

115

120

125

Leu Ala Asp Ala Ala Glu Ala Ala Asn Val Asp Leu Tyr Phe Glu Ala

130

135

140

Ala Val Ala Ala Ala Ile Pro Val Val Gly Pro Leu Arg Arg Ser Leu

- 49 -

145	150	155	160
Ala Gly Asp Gln Ile Gln Ser Val Met Gly Ile Val Asn Gly Thr Thr			
	165	170	175
Asn Phe Ile Leu Asp Ala Met Asp Ser Thr Gly Ala Asp Tyr Ala Asp			
	180	185	190
Ser Leu Ala Glu Ala Thr Arg Leu Gly Tyr Ala Glu Ala Asp Pro Thr			
	195	200	205
Ala Asp Val Glu Gly His Asp Ala Ala Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala			
	210	215	220
Ser Ile Ala Phe His Thr Arg Val Thr Ala Asp Asp Val Tyr Cys Glu			
	225	230	235
Gly Ile Ser Asn Ile Ser Ala Ala Asp Ile Glu Ala Ala Gln Gln Ala			
	245	250	255
Gly His Thr Ile Lys Leu Leu Ala Ile Cys Glu Lys Phe Thr Asn Lys			
	260	265	270
Glu Gly Lys Ser Ala Ile Ser Ala Arg Val His Pro Thr Leu Leu Pro			
	275	280	285
Val Ser His Pro Leu Ala Ser Val Asn Lys Ser Phe Asn Ala Ile Phe			
	290	295	300
Val Glu Ala Glu Ala Ala Gly Arg Leu Met Phe Tyr Gly Asn Gly Ala			
	305	310	315
Gly Gly Ala Pro Thr Ala Ser Ala Val Leu Gly Asp Val Val Gly Ala			
	325	330	335
Ala Arg Asn Lys Val His Gly Gly Arg Ala Pro Gly Glu Ser Thr Tyr			
	340	345	350
Ala Asn Leu Pro Ile Ala Asp Phe Gly Glu Thr Thr Thr Arg Tyr His			
	355	360	365
Leu Asp Met Asp Val Glu Asp Arg Val Gly Val Leu Ala Glu Leu Ala			
	370	375	380
Ser Leu Phe Ser Glu Gln Gly Ile Ser Leu Arg Thr Ile Arg Gln Glu			

- 50 -

385	390	395	400
Glu Arg Asp Asp Asp Ala Arg Leu Ile Val Val Thr His Ser Ala Leu			
	405	410	415
Glu Ser Asp Leu Ser Arg Thr Val Glu Leu Leu Lys Ala Lys Pro Val			
	420	425	430
Val Lys Ala Ile Asn Ser Val Ile Arg Leu Glu Arg Asp			
	435	440	445

配列番号 : 5

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成 DNA

配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTT 23

配列番号 : 6

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成 DNA

配列

ACGGAATTCA ATCTTACGGC C 21

配列番号 : 7

配列の長さ : 1643

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム・グルタミカム(Corynebacterium glutamicum)

株名：ATCC 13869

配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTTGTCTC AAATATTAAA TCGAATATCA ATATACGGTC	60
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCTGT	120
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
GTAAGTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAGGTGG CCCTGGTCGT ACAGAAATAT	240
GGCGGTTCCCT CGCTTGAGAG TGCGGAACGC ATTAGAAACG TCGCTGAACG GATCGTTGCC	300
ACCAAGAAGG CTGGAAATGA TGTCGTGGTT GTCTGCTCCG CAATGGGAGA CACCACGGAT	360
GAAGTTCTAG AACTTGCAGC GGCAGTGAAT CCCGTTCCGC CAGCTCGTGA AATGGATATG	420
CTCCTGACTG CTGGTGAGCG TATTTCTAAC GCTCTCGTCG CCATGGCTAT TGAGTCCCTT	480
GGCGCAGAAG CTCAATCTTT CACTGGCTCT CAGGCTGGTG TGCTCACCAC CGAGCGCCAC	540
GGAAACGCAC GCATTGTTGA CGTCACACCG GGTGCTGTGC GTGAAGCACT CGATGAGGGC	600
AAGATCTGCA TTGTTGCTGG TTTTCAGGGT GTTAATAAAG AAACCCGCGA TGTCACCACG	660
TTGGGTCGTG GTGGTTCTGA CACCACTGCA GTTGCGTTGG CAGCTGCTTT GAACGCTGAT	720
GTGTGTGAGA TTTACTCGGA CGTTGACGGT GTGTATACCG CTGACCCGCG CATCGTTCCT	780
AATGCACAGA AGCTGGAAAA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAAGTTGC TGCTGTTGGC	840
TCCAAGATTT TGGTGCTGCG CAGTGTGAA TACGCTCGTG CATTCAATGT GCCACTTCGC	900
GTACGCTCGT CTTATAGTAA TGATCCCGGC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT	960
CCTGTGGAAG AAGCAGTCCT TACCGGTGTC GCAACCGACA AGTCCGAAGC CAAAGTAACC	1020
GTTCTGGGTA TTTCCGATAA GCCAGGCGAG GCTGCCAAGG TTTTCCGTGC GTTGGCTGAT	1080
GCAGAAATCA ACATTGACAT GGTTCTGCAG AACGTCTCCT CTGTGGAAGA CGGCACCACC	1140
GACATCACGT TCACCTGCCC TCGCGTGAC GGACGCCGTG CGATGGAGAT CTTGAAGAAG	1200
CTTCAGGTTT AGGGCAACTG GACCAATGTG CTTTACGACG ACCAGGTCGG CAAAGTCTCC	1260
CTCGTGGGTG CTGGCATGAA GTCTACCCA GGTGTTACCG CAGAGTTCAT GGAAGCTCTG	1320
CGCGATGTCA ACGTGAACAT CGAATTGATT TCCACCTCTG AGATCCGCAT TTCCGTGCTG	1380
ATCCGTGAAG ATGATCTGGA TGCTGCTGCA CGTGCAATTG ATGAGCAGTT CCAGCTGGGC	1440

- 52 -

GGCGAAGACG AAGCCGTCGT TTATGCAGGC ACCGGACGCT AAAGTTTAA AGGAGTAGTT 1500  
 TTACAATGAC CACCATCGCA GTTGTGGTG CAACCGGCCA GGTCGGCCAG GTTATGCGCA 1560  
 CCCTTTTGA AGAGCGCAAT TTCCCAGCTG AACTGTTCG TTTCTTTGCT TCCCCGCGTT 1620  
 CCGCAGGCCG TAAGATTGAA TTC 1643

配列番号 : 8

配列の長さ : 1643

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

起源

生物名 : コリネバクテリウム・グルタミンカム(Corynebacterium glutamicum)

株名 : ATCC13869

配列の特徴 : mat peptide

存在位置 : 217..1479

特徴を決定した方法 : S

配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAA TCGAATATCA ATATACGGTC 60  
 TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCTGT 120  
 GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG 180  
 GTAACGTGCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAG GTG GCC CTG GTC GTA CAG 234  
 Met Ala Leu Val Val Gln  
 1 5  
 AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG GAA CGC ATT AGA AAC GTC 282  
 Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala Glu Arg Ile Arg Asn Val  
 10 15 20  
 GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT GGA AAT GAT GTC GTG GTT 330  
 Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala Gly Asn Asp Val Val Val  
 25 30 35

- 53 -

GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT GAA CTT CTA GAA CTT GCA	378
Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp Glu Leu Leu Glu Leu Ala	
40 45 50	
GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT GAA ATG GAT ATG CTC CTG	426
Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg Glu Met Asp Met Leu Leu	
55 60 65 70	
ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC GTC GCC ATG GCT ATT GAG	474
Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu Val Ala Met Ala Ile Glu	
75 80 85	
TCC CTT GGC GCA GAA GCT CAA TCT TTC ACT GGC TCT CAG GCT GGT GTG	522
Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr Gly Ser Gln Ala Gly Val	
90 95 100	
CTC ACC ACC GAG CGC CAC GGA AAC GCA CGC ATT GTT GAC GTC ACA CCG	570
Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg Ile Val Asp Val Thr Pro	
105 110 115	
GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC AAG ATC TGC ATT GTT GCT	618
Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly Lys Ile Cys Ile Val Ala	
120 125 130	
GGT TTT CAG GGT GTT AAT AAA GAA ACC CGC GAT GTC ACC ACG TTG GGT	666
Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg Asp Val Thr Thr Leu Gly	
135 140 145 150	
CGT GGT GGT TCT GAC ACC ACT GCA GTT GCG TTG GCA GCT GCT TTG AAC	714
Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala Leu Ala Ala Ala Leu Asn	
155 160 165	
GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCG GAC GTT GAC GGT GTG TAT ACC GCT	762
Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Ala	
170 175 180	
GAC CCG CGC ATC GTT CCT AAT GCA CAG AAG CTG GAA AAG CTC AGC TTC	810
Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys Leu Glu Lys Leu Ser Phe	
185 190 195	

GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC TCC AAG ATT TTG GTG CTG	858
Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly Ser Lys Ile Leu Val Leu	
200 205 210	
CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT GTG CCA CTT CGC GTA CGC	906
Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn Val Pro Leu Arg Val Arg	
215 220 225 230	
TCG TCT TAT AGT AAT GAT CCC GGC ACT TTG ATT GCC GGC TCT ATG GAG	954
Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu Ile Ala Gly Ser Met Glu	
235 240 245	
GAT ATT CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT GTC GCA ACC GAC AAG	1002
Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys	
250 255 260	
TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TCC GAT AAG CCA GGC GAG	1050
Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu	
265 270 275	
GCT GCC AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA GAA ATC AAC ATT GAC	1098
Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp	
280 285 290	
ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA GAC GGC ACC ACC GAC ATC	1146
Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile	
295 300 305 310	
ACG TTC ACC TGC CCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT GCG ATG GAG ATC TTG	1194
Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu	
315 320 325	
AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC	1242
Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp	
330 335 340	
CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA	1290
Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro	
345 350 355	



- 55 -

GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC	1338
Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn	
360 365 370	
ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT	1386
Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg	
375 380 385 390	
GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG	1434
Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln	
395 400 405	
CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC	1479
Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg	
410 415 420	
TAAAGTTTTA AAGGAGTAGT TTTACAATGA CCACCATCGC AGTTGTTGGT GCAACCGGCC	1539
AGGTCGGCCA GGTTATGCGC ACCCTTTTGG AAGAGCGCAA TTTCCAGCT GACACTGTTC	1599
GTTTCTTTGC TTCCCCGCGT TCCGCAGGCC GTAAGATTGA ATTC	1643

配列番号 : 9

配列の長さ : 421

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

Met Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala	
1 5 10 15	
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala	
20 25 30	
Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp	
35 40 45	
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg	
50 55 60	

- 56 -

Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu			
65	70	75	80
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr			
	85	90	95
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg			
	100	105	110
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly			
	115	120	125
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg			
	130	135	140
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala			
145	150	155	160
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val			
	165	170	175
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys			
	180	185	190
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly			
	195	200	205
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn			
	210	215	220
Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu			
225	230	235	240
Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr			
	245	250	255
Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile			
	260	265	270
Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp			
	275	280	285
Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu			
	290	295	300

- 57 -

Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg  
 305                      310                      315                      320  
 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr  
                          325                      330                      335  
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala  
                          340                      345                      350  
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu  
                          355                      360                      365  
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg  
                          370                      375                      380  
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala  
 385                      390                      395                      400  
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr  
                          405                      410                      415  
 Ala Gly Thr Gly Arg  
                          420

配列番号 : 10

配列の長さ : 1643

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

起源

生物名 : コリネバクテリウム グルタミンカム(Corynebacterium glutamicum)

株名 : ATCC13869

配列の特徴 : mat peptide

存在位置 : 964..1479

特徴を決定した方法 : S

配列

- 58 -

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTTGTCTC AAATATTTAA TCGAATATCA ATATACGGTC	60
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCTGT	120
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
GTAACGTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAGGTGG CCCTGGTCGT ACAGAAATAT	240
GGCGGTTTCCT CGCTTGAGAG TGCGGAACGC ATTAGAAACG TCGCTGAACG GATCGTTGCC	300
ACCAAGAAGG CTGGAAATGA TGTCGTGGTT GTCTGCTCCG CAATGGGAGA CACCACGGAT	360
GAACCTCTAG AACTTGCAGC GGCAGTGAAT CCCGTTCCGC CAGCTCGTGA AATGGATATG	420
CTCCTGACTG CTGGTGAGCG TATTTCTAAC GCTCTCGTCG CCATGGCTAT TGAGTCCCTT	480
GGCGCAGAAG CTCAATCTTT CACTGGCTCT CAGGCTGGTG TGCTCACCAC CGAGCGCCAC	540
GGAAACGCAC GCATTGTTGA CGTCACACCG GGTGCTGTGC GTGAAGCACT CGATGAGGGC	600
AAGATCTGCA TTGTTGCTGG TTTTCAGGGT GTTAATAAAG AAACCCGCGA TGTCACCACG	660
TTGGGTCGTG GTGGTTCTGA CACCACTGCA GTTGCGTTGG CAGCTGCTTT GAACGCTGAT	720
GTGTGTGAGA TTTACTCGGA CGTTGACGGT GTGTATACCG CTGACCCGCG CATCGTTCCT	780
AATGCACAGA AGCTGGAAAA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAACCTGC TGCTGTTGGC	840
TCCAAGATTT TGGTGCTGCG CAGTGTTGAA TACGCTCGTG CATTCAATGT GCCACTTCGC	900
GTACGCTCGT CTTATAGTAA TGATCCCGGC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT	960
CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA	1008
Met Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu	
1 5 10 15	
GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TCC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCC	1056
Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala	
20 25 30	
AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT	1104
Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val	
35 40 45	
CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC	1152
Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe	
50 55 60	

- 59 -

ACC TGC CCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG	1200
Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys	
65 70 75	
CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC	1248
Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val	
80 85 90 95	
GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT	1296
Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val	
100 105 110	
ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA	1344
Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu	
115 120 125	
TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT	1392
Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp	
130 135 140	
GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC	1440
Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly	
145 150 155	
GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAAAGTTTTA	1489
Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg	
160 165 170	
AAGGAGTAGT TTTACAATGA CCACCATCGC AGTTGTTGGT GCAACCGGCC AGGTCGGCCA	1549
GGTTATGCGC ACCCTTTTGG AAGAGCGCAA TTTCCCAGCT GACACTGTTC GTTCTTTGC	1609
TTCCCCGCGT TCCGCAGGCC GTAAGATTGA ATTC	1643

配列番号 : 11

配列の長さ : 172

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

- 60 -

## 配列

Met	Glu	Glu	Ala	Val	Leu	Thr	Gly	Val	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Glu	Ala
1				5					10					15	
Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ile	Ser	Asp	Lys	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala	Lys
			20					25					30		
Val	Phe	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Glu	Ile	Asn	Ile	Asp	Met	Val	Leu
		35				40						45			
Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Val	Glu	Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Ile	Thr	Phe	Thr
	50					55					60				
Cys	Pro	Arg	Ala	Asp	Gly	Arg	Arg	Ala	Met	Glu	Ile	Leu	Lys	Lys	Leu
65				70					75					80	
Gln	Val	Gln	Gly	Asn	Trp	Thr	Asn	Val	Leu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Val	Gly
			85					90					95		
Lys	Val	Ser	Leu	Val	Gly	Ala	Gly	Met	Lys	Ser	His	Pro	Gly	Val	Thr
			100					105					110		
Ala	Glu	Phe	Met	Glu	Ala	Leu	Arg	Asp	Val	Asn	Val	Asn	Ile	Glu	Leu
		115				120						125			
Ile	Ser	Thr	Ser	Glu	Ile	Arg	Ile	Ser	Val	Leu	Ile	Arg	Glu	Asp	Asp
	130					135						140			
Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	His	Glu	Gln	Phe	Gln	Leu	Gly	Gly
145				150					155					160	
Glu	Asp	Glu	Ala	Val	Val	Tyr	Ala	Gly	Thr	Gly	Arg				
				165					170						

配列番号 : 12

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成 DNA

- 61 -

## 配列

GCCAGGCGAG CGTGCCAAGG TTT 23

配列番号 : 13

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成 DNA

## 配列

GCCAGGCGAG GATGCCAAGG TTT 23

配列番号 : 14

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成 DNA

## 配列

GCCAGGCGAG TGTGCCAAGG TTT 23

配列番号 : 15

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成 DNA

## 配列

GCCAGGCGAG TTTGCCAAGG TTT 23

- 62 -

配列番号：16

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成 DNA

配列

GCCAGGCGAG CCTGCCAAGG TTT 23

配列番号：17

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成 DNA

配列

GCCAGGCGAG TCTGCCAAGG TTT 23

配列番号：18

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成 DNA

配列

GCCAGGCGAG TATGCCAAGG TTT 23

配列番号：19

配列の長さ：23

配列の型：核酸



- 63 -

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成 DNA

配列

GCCAGGCGAG GTTGCCAAGG TTT 23

## 請求の範囲

1. N末端から23番目のロイシン残基及び104番目のバリン残基の少なくとも一方が他のアミノ酸残基に変化したコリネホルム細菌由来のホモセリンデヒドロゲナーゼをコードするDNA断片。
2. N末端から23番目のロイシン残基及び104番目のバリン残基の少なくとも一方が他のアミノ酸残基に変化した変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を保持するコリネホルム細菌。
3. 前記変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がコリネホルム細菌の染色体上のホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子との相同組換えにより染色体DNAに組み込まれて形質転換されたことを特徴とする請求項2記載のコリネホルム細菌。
4. 前記他のアミノ酸残基が、23番目のロイシン残基にあってはフェニルアラニン残基であり、104番目のバリン残基にあってはイソロイシン残基である請求項2または3記載のコリネホルム細菌。
5. コリネホルム細菌由来のホモセリンデヒドロゲナーゼの一部をコードするDNA断片が、コリネホルム細菌の染色体上のホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子との相同組換えにより染色体DNAに組み込まれることによって、ホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子が破壊されたことを特徴とするコリネホルム細菌。
6. コリネホルム細菌由来のアスパルトキナーゼ遺伝子とコリネホルム細菌細胞内で自律複製可能なベクターとを連結してなる組換えDNAを細胞内に保持し、かつ、野生型ホモセリンデヒドロゲナーゼを発現しないことを特徴とするコリネホルム細菌。
7. 前記アスパルトキナーゼ遺伝子が、L-リジン及びL-スレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子である請求項6記載のコリネホルム細菌。
8. コリネホルム細菌由来のアスパルトキナーゼであってL-リジン及びL-スレオニンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子が、コリネホルム細菌の染色体DNAに組み込まれて形質転換され、かつ、野生型ホモセリンデヒドロゲナーゼを発現しないことを特徴とするコリネ

ホルム細菌。

9. L-リジン及びL-スレオニンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼが、 $\alpha$ サブユニットではN末端から279番目のアラニン残基がアラニン以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に、 $\beta$ サブユニットでは30番目のアラニン残基がアラニン以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化した変異型アスパルトキナーゼであることを特徴とする請求項7又は8記載のコリネホルム細菌。

10. 請求項6～9のいずれか一項において、コリネホルム細菌由来のホモセリンデヒドロゲナーゼであってN末端から23番目のロイシン残基及び104番目のバリン残基の少なくとも一方が他のアミノ酸残基に変化した変異型ホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子がコリネホルム細菌の染色体上のホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子との相同組換えにより染色体に組み込まれて形質転換されたことにより、野生型ホモセリンデヒドロゲナーゼを発現しないことを特徴とするコリネホルム細菌。

11. 請求項6～9のいずれか一項において、コリネホルム細菌由来のホモセリンデヒドロゲナーゼの一部をコードするDNA断片がコリネホルム細菌の染色体上のホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子との相同組換えにより染色体に組み込まれることによって、ホモセリンデヒドロゲナーゼ遺伝子が破壊され、野生型ホモセリンデヒドロゲナーゼを発現しないことを特徴とするコリネホルム細菌。

12. 請求項2～11のいずれか一項に記載のコリネホルム細菌を好適な培地で培養し、該培養物中にL-リジンを生産蓄積せしめ、該培養物からL-リジンを採取することを特徴とするL-リジンの製造法。

1/7

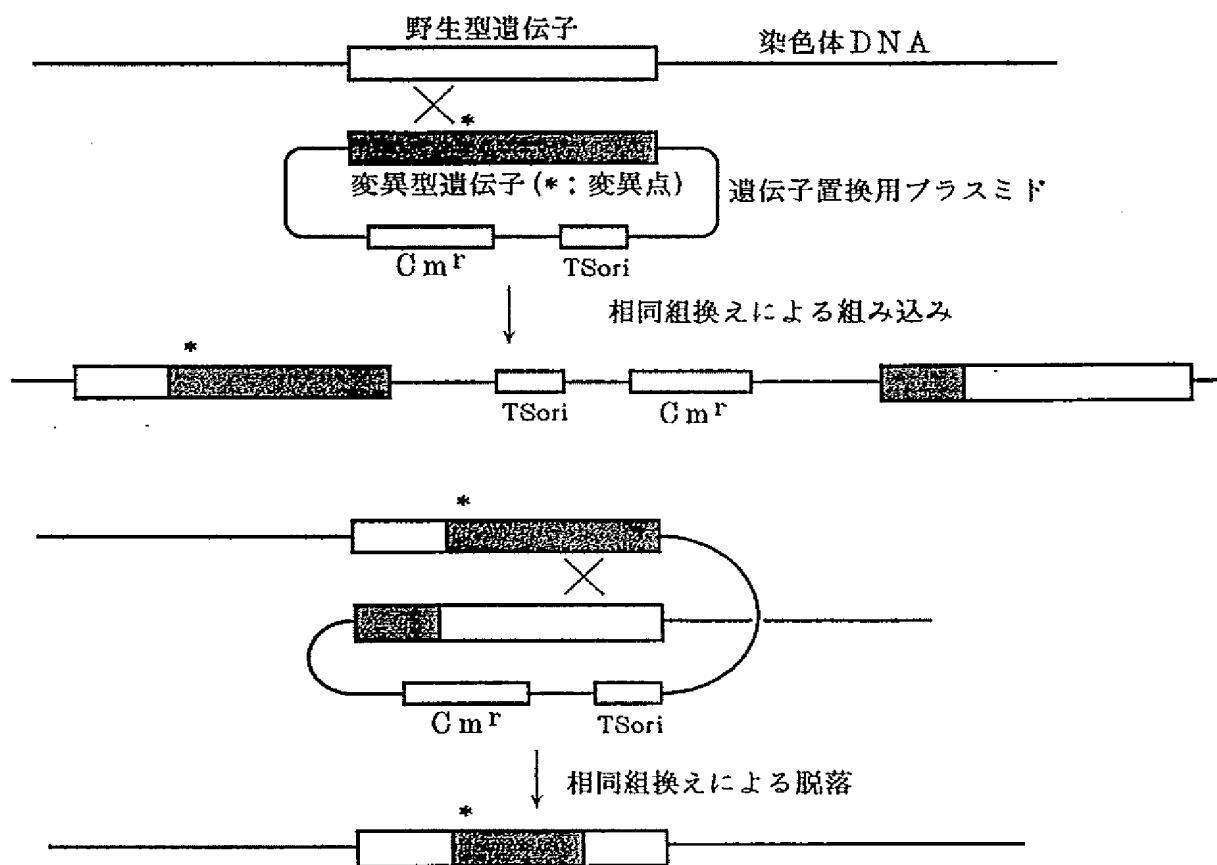


Fig. 1

2/7

B L	M T S A S A P S F N P G K G P G S A V G I A L L G F G T V G T E	32
B S	V R V T H Q M L F N T D Q - - - - A I R V G L L G L G T V G S G	17
E 1	I Q G L H Q S V F R A E K - - - - R I G L V L F G K G N I G S R	479
E 2		471
B L	V M R L M T E Y G D E L A H R I G G P L E V R G I A - V S D I S	63
B S	V V K I I Q D H Q Q D K L M H Q V G C P - - V - T - - S	42
E 1	L L E L L K R R Q Q S W L K N K - - - H I D L R V C - G V A N - S	506
E 2	W L E L F A R E Q Q S T L S A R - - - T G F E P V L A G V V D - S	499
B L	K - - - - P R E G V A P E V L L T E D A K R A F A V L I E R E D V D I V	90
B S	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	62
E 1	K - - A L L T S Y - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	537
E 2	R R S L L S Y - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	530
B L	V E V I G G I E Y P R E - V V L A A - - - - - - - - - - - - - - - - -	108
B S	I R L V K E Y H L P D V - V V I V N C T A S S Q A V A D Q Q Y L V D A	93
E 1	F - - L W M R A H P D L V V L D C V T S S Q Q Q L A D Q Y L A D F L A	568
E 2		561
B L	- K A G K K S V V T A N K - A L V A A H S A E - - L A D A A E A A A	136
B S	- L R R E G K F H V V T A N K K - D L M A S - - - - - - - - - - - - -	121
E 1	- - S H G F H V V T A N K K L A G A S - S M N K Y Y H Q I H D A A A E A K S	599
E 2		592
B L	N V D - L Y F E A A V A A A I P V V G P L R R S L - A G D Q I Q	166
B S	N G C F D I Y F E A S V A G A G I P I V L R T L E E G L L S S - D R I T M	152
E 1	G R R H W L Y - N A T V G A G L P I N H T V R D L I D S G D T I L	630
E 2		623
B L	S V M G I V N G T T N F I L D A M - D S T G A D Y A D S L A - A	197
B S	K M M G I V N G T T N F I L T K M - I K E G S P - Y E - - - - E V	179
E 1	K F S G I L S G T L S W L F L Q - - F D G S V P - F T - - - - E A	656
E 2	S I S G I F S G T L S W L F L Q - - F D G S V P - F T - - - - E L	649
B L	T R - - - - L G Y A E A D P T A D V E G H D A A S K A A I L A S	225
B S	L K E A Q D L G F A E A D P T S D V E G L D A A R K K M A I L A R	211
E 1	T R L A R E M G Y T E P D P R D D L S G M D V A R K L L I L A R	688
E 2	V D Q A W Q Q G L T E P D P R D D L S G K D V S R K L V I L A R	681

BL: プレバクテリウム・ラクトファーメンタム

BS: バチルス・サブチリス

E1: E. coli HDI

E2: E. coli HDII

\*: 3種に共通なアミノ酸

\*\*: 4種に共通なアミノ酸

Fig. 2

3/7

B L	I A F H T R V T A D D V Y C E G I S N I S A A D I E - A A Q Q A	256
B S	L - G F S M N Y D L E D Y K V K G I S Q I T D E D I S F - - -	238
E 1	E T G R E L E L A D I E I E P V L P A E F N A E G D V A A F M A	720
E 2	E A G Y N I E P D Q V R V E S L V P A - H C E G G S I D H F F E	712
B L	G H T I - - - - - - - - - - K L L A I C E X F T N K E G K S	276
B S	- - - - - - - - - - S K R L G Y T M K L I G I A Q R D G S K	258
E 1	N L S Q L D D L F A A R V A K A R D E G K V L R Y V G N I D E D	752
E 2	N G D E L N E Q M V Q R L E A A R E M G L V L R Y V A R F D A N	744
B L	A I S A R V H P T L L P V S H P L A S V H K S F N A I F V E A E	308
B S	I E - V S V Q P T L L P D H H P L S A V H N E F N A V Y V Y G E	289
E 1	G V - C R V K I A E V D G N D P L F K V K N G E N A L A F Y S H	783
E 2	G K - A R V G V E A V R E D B P L A S L L P C D N V F A I E S R	775
B L	A A G R L M F Y - - G H G A G G A P T A S A V L G D V V G A A R	338
B S	A V G E T M F Y - - G P G A G S M P T A T S V V S D L V A V M K	319
E 1	Y Y Q P L P L V L R G Y G A G N D V T A A G V F A D L L R T L S	814
E 2	W Y R D N P L V I R G P G A G R D V T A G A I Q S D I N R L A Q	806
B L	N K V H G G R A P G E S T Y A N L P I A D F G E T T T R Y H L D	370
B S	N M R L G V T G N S F V G P Q Y E K N M K S P S D I Y A Q Q P L	351
E 1	W K - L G V	817
E 2	L - - L	806
B L	M D - V E D R V G V L A E L A S L F S E Q G I S L R T I R Q E E	401
B S	R I H V K D E V G S F S K I T S V F S E R G V S F E K I L Q L P	383
B L	R D D - - - D A R L I V V T H S A L E S D L S R I V E L L K A K	430
B S	I K G H D E L A E I V I V T H H T S E A D F S D I L Q N L N D L	415
B L	P V V K A I N S V I R L E R D	445
B S	E V V Q E V K S T Y R V E G N G W S	433

Fig. 3

4 / 7

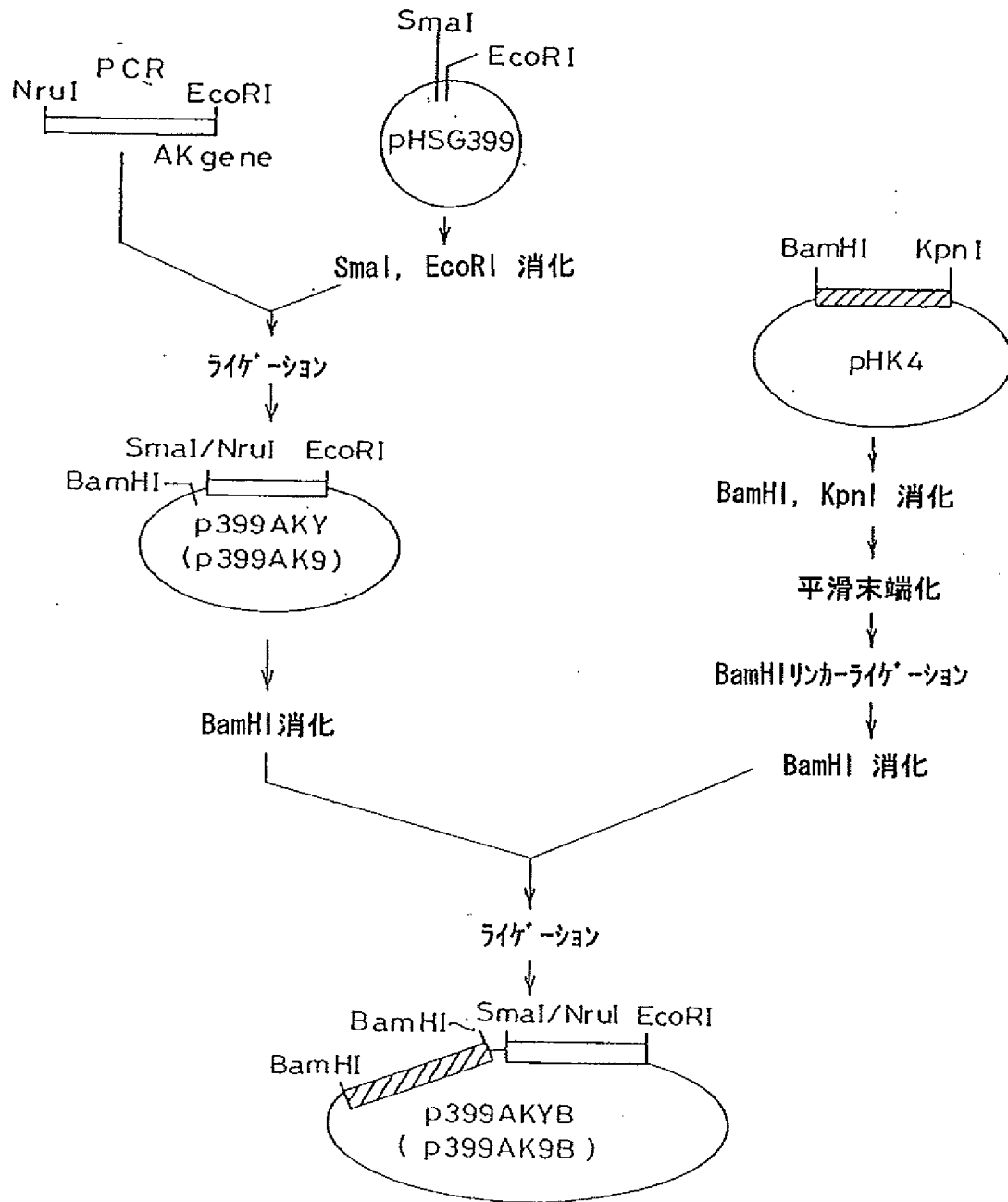


Fig. 4

5/7

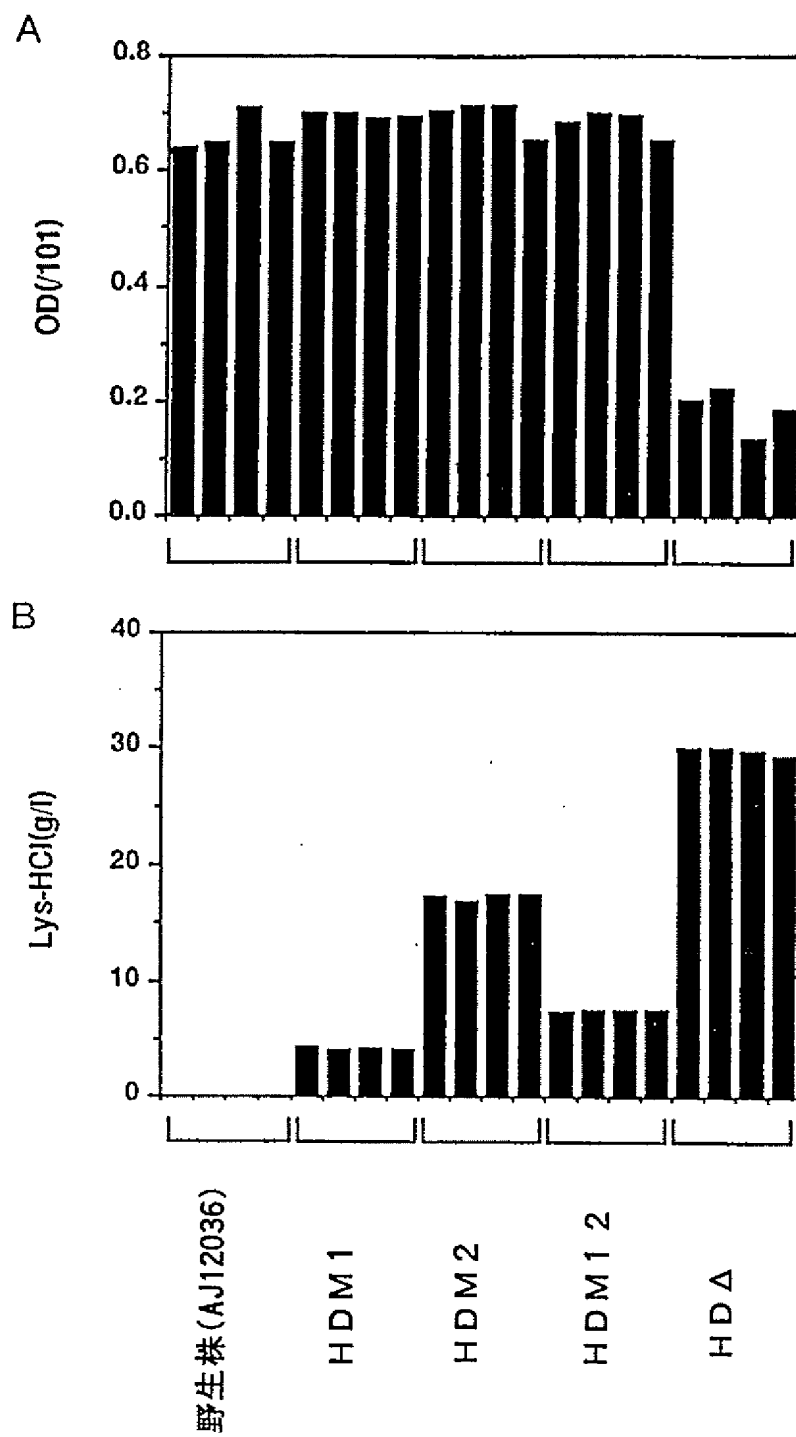
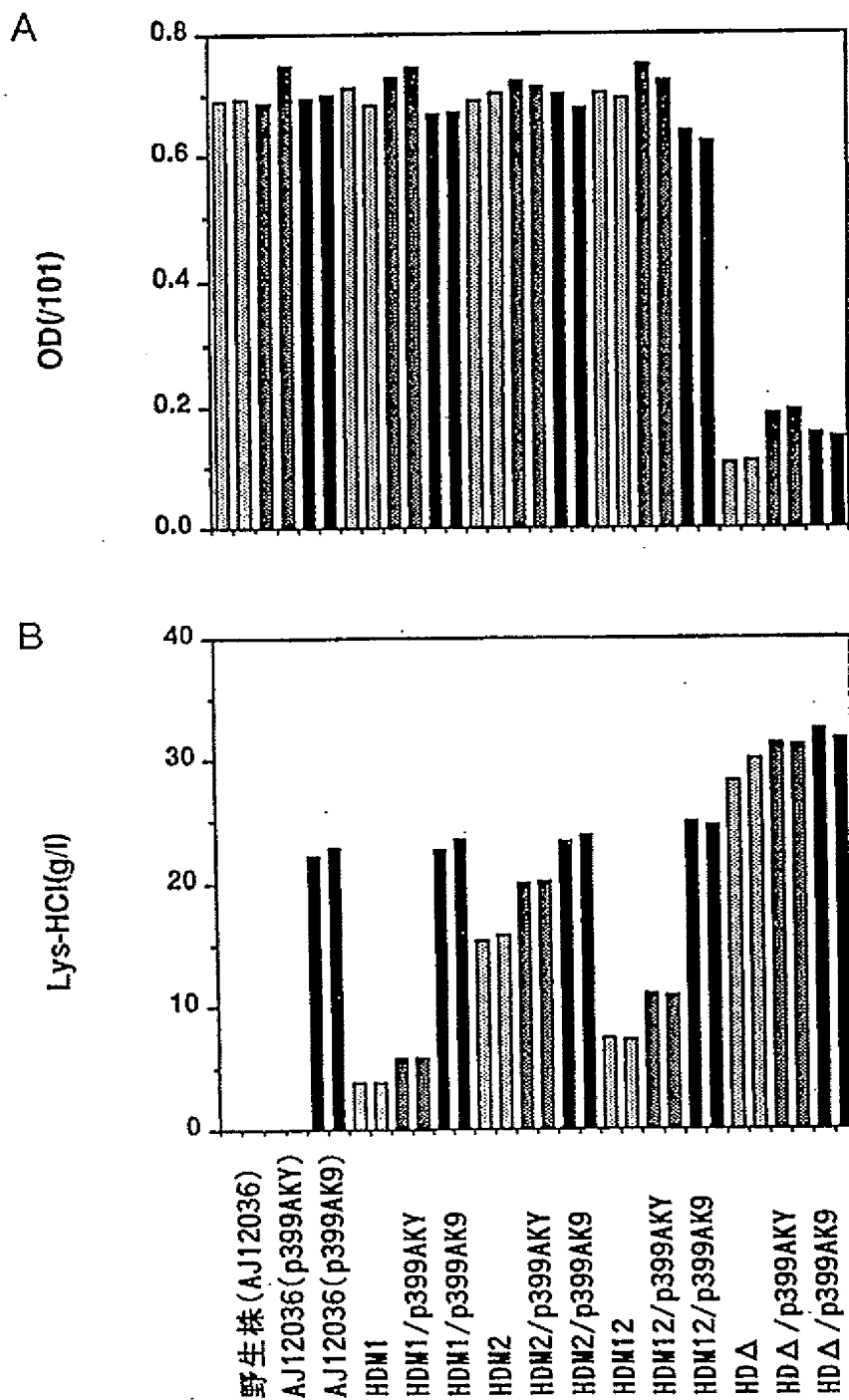


Fig. 5



6/7



7/7

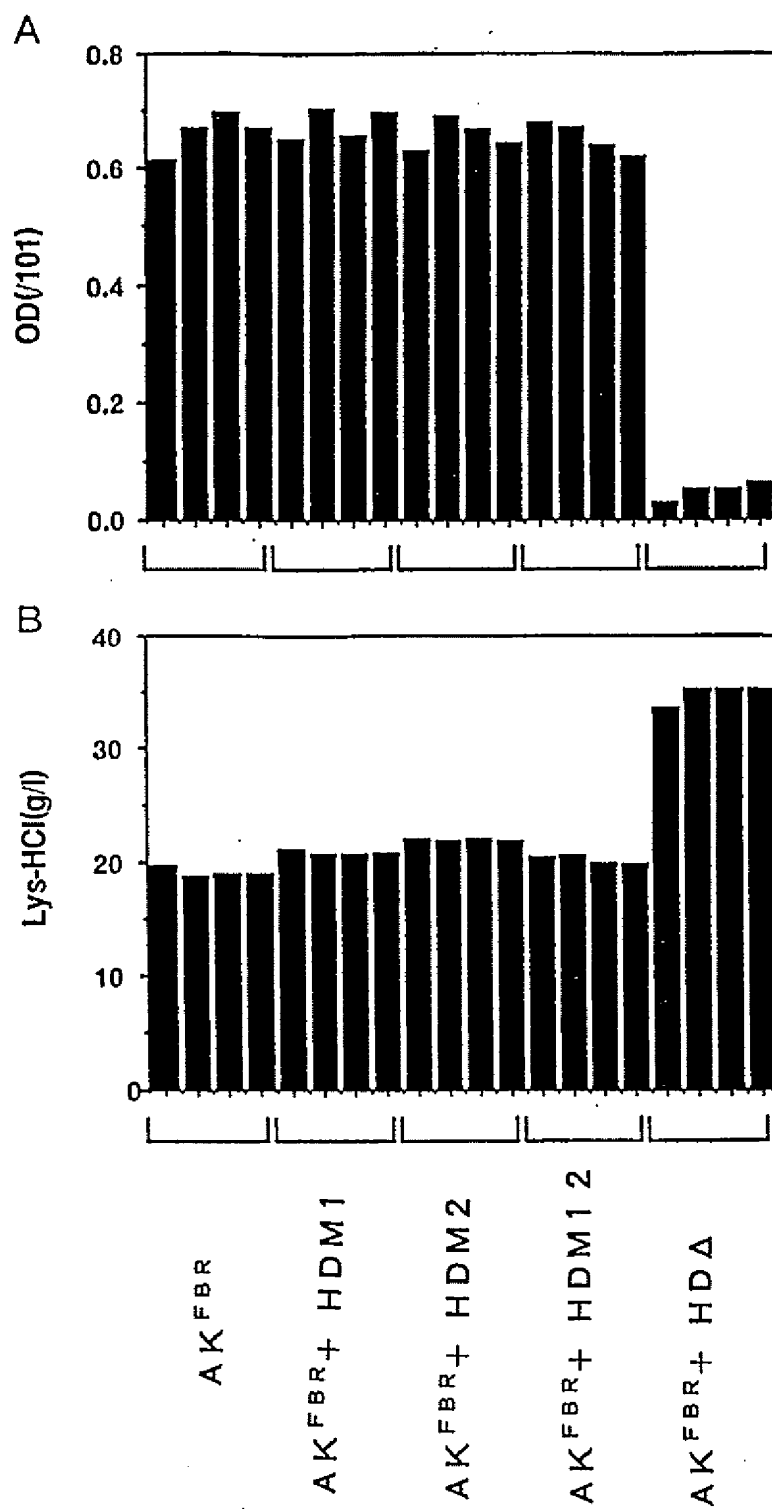


Fig. 7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/00268

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/53, C12P13/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/53, C12P13/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS BIOSIS WPI, WPI/L

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Mol. Microbiol. Vol. 2, No. 1 (1988), Peoples, O. P. et al. "Nucleotide sequence and fine structural analysis of the Corynebacterium glutamicum hom-thr B operon" p. 63-72	5, 6, 7, 8/ 1-4, 9-12
Y/A	Mol. Microbiol. Vol. 5, No. 5 (1991), Kalinowski, J. et al. "Genetic biochemical analysis of the aspartokinase from Corynebacterium glutamicum" p. 1197-1204	6,7,8/9-12
Y/A	JP, A, 3-219885 (Degussa AG.), September 27, 1991 (27. 09. 91), & EP, A1, 387527	6,7,8/12
A	J, Gen. Appl. Microbiol. Vol. 7, No. 3 (1961) Nakayama et al. p. 145-154	1 - 12
Y/A	EP, A, 435132 (FORSCHUNGSZENT JUELICH GMBH), July 3, 1991 (03. 07. 91), & DE, A, 3943117	6,7,8/9-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

April 13, 1995 (13. 04. 95)

Date of mailing of the international search report

May 2, 1995 (02. 05. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>5</sup> C12N15/53, C12P13/08

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>5</sup> C12N15/53, C12P13/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS BIOSIS WPI, WPI/L

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/A	Mol. Microbiol. 第2巻第1号 (1988), Peoples, O. P. et al. 「Nucleotide sequence and fine structural analysis of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> hom-thrB operon」 p. 63-72	5, 6/1-4, 7, 8/9-12
Y/A	Mol. Microbiol. 第5巻第5号 (1991), Kalinowski, J. et al. 「Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from <i>Corynebacterium glutamicum</i> 」 p. 1197-1204	6, 7, 8/9-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.04.95

国際調査報告の発送日

02.05.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

4 B 9 3 5 9

種 村 慈 樹 印

電話番号 03-3581-1101 内線

3449

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/A	JP, A, 3-219885 (デグッサ・アクチエンゲゼルシャフト), 27. 9月. 1991 (27. 09. 91) &EP, A1, 387527	6, 7, 8/12
A	J. Gen. Appl. Microbiol. 第7巻第3号 (1961) Nakayama et al. p. 145-154	1-12
Y/A	EP, A, 435132 (FORSCHUNGSZENT JUELICH GMBH), 3. 7月. 1991 (03. 07. 91) &DE, A, 3943117	6, 7, 8/9-12